



**Claudio Fernando Magron**

**ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS  
CULTIVÁVEIS PRESENTES NA COMPOSTAGEM DE RESÍDUOS  
ORGÂNICOS DO ZOOLOGICO DE SÃO PAULO E PRODUTORAS DE  
AMILASES E PROTEASES**

**2014**



**Claudio Fernando Magron**

**ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS  
CULTIVÁVEIS PRESENTES NA COMPOSTAGEM DE RESÍDUOS  
ORGÂNICOS DO ZOOLOGICO DE SÃO PAULO E PRODUTORAS DE  
AMILASES E PROTEASES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Biologia Química da Universidade Federal de São  
Paulo como requisito para obtenção do título de Mestre  
em Ciências, área de concentração Biologia Química.

**2014**

**Claudio Fernando Magron**

**ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS  
CULTIVÁVEIS PRESENTES NA COMPOSTAGEM DE RESÍDUOS  
ORGÂNICOS DO ZOOLOGICO DE SÃO PAULO E PRODUTORAS DE  
AMILASES E PROTEASES**

Orientador: Professor Doutor Julio Cezar Franco de Oliveira

Coorientadora: Professora Doutora Renata Castiglioni Pascon

Aluno: Claudio Fernando Magron

**2014**

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Interações Microbianas (LIMic), Departamento de Ciências Biológicas da UNIFESP - campus Diadema, com o auxílio financeiro CAPES e FAPESP dos Projetos nos 2009/52030-5 e 2011/50870-6. CEP1073/11.

**Claudio Fernando Magron**

**ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS  
CULTIVÁVEIS PRESENTES NA COMPOSTAGEM DE RESÍDUOS  
ORGÂNICOS DO ZOOLOGICO DE SÃO PAULO E PRODUTORAS DE  
AMILASES E PROTEASES**

**Presidente da Banca**

Professor Doutor Julio Cezar Franco de Oliveira

**Banca Examinadora**

Professora Dra. Aline Maria da Silva

Professora Dra. Cristina Rossi Nakayama

Professor \_Dr. Ronaldo Bento Quaggio

**Suplentes:**

Professor Dr. Marcelo Afonso Vallim

Professor Dr. Joel Machado Junior

## AGRADECIMENTOS

Agradeço por esse trabalho primeiramente a Deus, quem me permitiu realizá-lo, e com ele fico comprometido a fazer bom uso deste título, em prol do próximo, promessa que fiz ao ingressar no programa de mestrado!

Em segundo lugar, agradeço a todos que me ajudaram de alguma forma a concluir esse trabalho, como meus pais Jobem e Rosy e meu irmão Renato, que sempre me deram apoio e compreensão em todo o período de estudos, assim como meu orientador Prof. Dr. Julio, que nas adversidades, dúvidas e nos esclarecimentos nunca me negou ajuda, além de sua compreensão e seu apoio em problemas pessoais que tive durante a pesquisa; não fosse por isso eu provavelmente não estaria hoje defendendo a dissertação. Às professoras Renata Pascon, coorientadora, Cristina Viana Niero e ao professor Marcelo Vallim, que deram sugestões, explicações e dicas que foram de extrema importância para o desenvolvimento do projeto e para meu aprendizado. Ao primo Pedro Barros, quem editou o trabalho final e o de qualificação, e aos alunos de iniciação científica: Gustavo Aranha, Leandro Freddi, Leticia Togni, Paul Fooster, Raquel Ryuzo, que contribuíram muito para as pesquisas.

A outros colegas mestrandos: Bianca, Camila, João, Urze, que sempre estivemos juntos, trocando informações e conhecimentos; além de toda a equipe do laboratório LIMic 29; ao amigo Luciano e a minha namorada Tatiane, que me apoiaram muito e me deram força nos momentos difíceis, tornando tudo mais fácil para mim. Agradeço também ao eterno amigo Alexandre, quem me apoiava em horas de estresse com seu bom humor e sua maneira de viver a vida, amigo que infelizmente não é mais vivo materialmente, agradeço também à Denise Gomes por ter me apresentado ao programa de pós-graduação da UNIFESP.

Indiretamente, agradeço às minhas filhas Camila, Julia e Renata, responsáveis pela motivação de minha obrigação como pai de dar-lhes um futuro melhor, formando os pilares de minha vida e, consecutivamente, da construção deste trabalho!

## SUMÁRIO

	<b>Lista de Abreviaturas .....</b>	<b>VIII</b>
	<b>Lista de Figuras .....</b>	<b>X</b>
<b>1.</b>	<b>Resumo.....</b>	<b>XII</b>
<b>2.</b>	<b>Introdução e Justificativa, com síntese da bibliografia fundamental .....</b>	<b>1</b>
<b>3.</b>	<b>Objetivos .....</b>	<b>6</b>
<b>3.1.</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>6</b>
<b>4.</b>	<b>Material e Métodos .....</b>	<b>7</b>
<b>4.1.</b>	<b>Coleta de amostras de compostagem .....</b>	<b>7</b>
<b>4.2.</b>	<b>Preparo dos meios de cultura .....</b>	<b>7</b>
<b>4.3.</b>	<b>Diluição seriada.....</b>	<b>8</b>
<b>4.4.</b>	<b>Isolamento e preservação de microrganismos cultivados.....</b>	<b>9</b>
<b>4.5.</b>	<b>Seleção de microrganismos produtores de amilases e proteases .....</b>	<b>9</b>
<b>4.6.</b>	<b>Quantificação de halo de degradação em placa de amido e caseína .....</b>	<b>10</b>
<b>4.7.</b>	<b>Coloração de Gram.....</b>	<b>10</b>
<b>4.8.</b>	<b>Caracterização de isolados por espectrometria de massa (MALDI TOF-MS) e sequenciamento do genes 16S rRNA .....</b>	<b>11</b>
<b>4.9.</b>	<b>Curva de crescimento dos isolados amilolíticos.....</b>	<b>12</b>
<b>4.10.</b>	<b>Quantificação da atividade amilolítica em sobrenadante de culturas.....</b>	<b>12</b>
<b>4.11.</b>	<b>Bradford.....</b>	<b>13</b>
<b>4.12.</b>	<b>Testes bioquímico-metabólicos com isolados bacterianos.....</b>	<b>14</b>
<b>4.12.1.</b>	<b>Produção de Indol.....</b>	<b>14</b>
<b>4.12.2.</b>	<b>Voges Proskauer.....</b>	<b>14</b>
<b>4.12.3.</b>	<b>Citrato de Simmons.....</b>	<b>15</b>
<b>4.12.4.</b>	<b>Sulfeto de hidrogênio.....</b>	<b>15</b>
<b>4.12.5.</b>	<b>Uréia.....</b>	<b>15</b>
<b>4.12.6.</b>	<b>Triptofano desaminase.....</b>	<b>15</b>
<b>4.12.7.</b>	<b>Aminoácidos Lisina, Arginina e Ornitina.....</b>	<b>15</b>

4.12.8.	Malonato.....	15
4.12.9.	Hidrólise da esculina.....	15
4.12.10.	Fermentação de açúcares.....	15
4.12.11.	Fermentação da lactose.....	15
4.12.12.	Oxidase.....	15
5.	Resultados e discussão.....	16
5.1.	Coleta de amostras de compostagem na UPCO do Zoológico de São Paulo.....	17
5.2.	Cultivo e isolamento de microrganismos presentes na compostagem.....	19
5.2.1.	Registro de dados do processo de isolamento de microrganismos da C28 .....	22
5.2.2.	Isolados Adquiridos em momentos do processo de compostagem .....	22
5.2.3.	Características fenotípicas dos isolados .....	23
5.3.	Seleção de microrganismos capazes de secretar amilases e/ou proteases.....	24
5.4.	Seleção de microrganismos formadores de halo de degradação em placa.....	27
5.5.	Seleção dos melhores produtores de amilase e protease .....	28
5.6.	Caracterização de isolados por coloração de Gram .....	32
5.7.	Identificação de isolados por espectrometria de massa .....	34
5.8.	Crescimento dos microrganismos.....	37
5.9.	Medida da atividade de amilase.....	39
5.10.	Macro morfologia dos 9 Isolados selecionados.....	41
5.11.	Testes bioquímicos.....	43
5.12.	Sequenciamento de amplicons do 16S rDNA de 9 isolados bacterianos.....	46
6.	Conclusão .....	49
7.	Referências Bibliográficas.....	50



## Lista de abreviaturas

®	Marca registrada
°C	Graus Celsius
µl	Microlitro
1 <sup>a</sup>	Primeira
2 <sup>a</sup>	Segunda
3 <sup>a</sup>	Terceira
4 <sup>a</sup>	Quarta
5 <sup>a</sup>	Quinta
ACT	Actinomicetes
AN	Ágar Nutriente
BHI	Brain Heart Infusion
C	Carbono
C28	Composteira 28
CaCO <sub>3</sub>	Carbonato de Cálcio
D.P.	Desvio padrão
Dil.	Diluição
DNS	Acido Dinitrosalicílico
FeSO <sub>4</sub>	Sulfato Férrico
FPZSP	Fundação Parque Zoológico de São Paulo
g	Gramma
H <sub>2</sub> O	Água
HCl	Acido clorídrico
hs	Horas
ICM-MS	A utilização de células intactas para espectrometria de massa
ITS	Internal transcribed spacer
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Sulfato de Potássio bibásico
KCl	Cloreto de Potássio
KDa	Kilo Dalton
kg/Dia	Quilograma por dia
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sulfato de Potássio monobásico
KNO <sub>3</sub>	Nitrato de Potássio
L	Litro
LB	Luria Bertani
LIMic	Laboratório de Interações Microbianas
m <sup>2</sup>	Metros quadrados
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Ionização do Composto através da Matriz
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de Magnésio
ml	Mililitro
MRS	Meio de cultura para lactobacilos
MS	Mass Spectrometry – Espectrometria de Massa

N	Nitrogênio
NaOAc	Tampão Acetato de Sódio
NaCl	Cloreto de Sódio
pH	Potencial de Hidrogênio
R2-A	Meio de cultura com marca registrada
ref.	Referência
rRNA	RNA Ribossomal
Score	Valor numérico de pontuação
SSU 16S	Subunidade menor do ribossomo, porção 16.
TOF	Time-of-Flight – Analisador por tempo de voo
TSA	Meio de cultura com marca registrada
UCM	Unifesp Claudio Magron (código que caracteriza pesquisador da amostra)
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
UPCO	Unidade Produtora de Compostos Orgânicos

<b>Figura 1.</b>	<b>Curva de calibração para a solução de Acido Dinitrosalicílico.....</b>	<b>8</b>
<b>Figura 2.</b>	<b>Diluição seriada (1/10) de suspensão contendo amostra de compostagem.....</b>	<b>13</b>
<b>Figura 3.</b>	<b>Coleta realizada com o auxílio de trado. Composteira 28 (3ª coleta:30/08/2012).....</b>	<b>18</b>
<b>Figura 4.</b>	<b>Perfil da compostagem efetuada.....</b>	<b>19</b>
<b>Figura 5.</b>	<b>Registro fotográfico digitalizado.....</b>	<b>20</b>
<b>Figura 6.</b>	<b>Amostras Isolados adquiridos ao longo dos isolamentos.....</b>	<b>21</b>
<b>Figura 7.</b>	<b>Registro fotográfico de isolados microbianos.....</b>	<b>22</b>
<b>Figura 8.</b>	<b>Número de isolados obtidos em cada ponto de coleta.....</b>	<b>23</b>
<b>Figura 9.</b>	<b>Número total de isolados divididos, em mucoides e não mucoides.....</b>	<b>24</b>
<b>Figura 10.</b>	<b>Triagem para seleção de isolados amilolíticos e proteolíticos.....</b>	<b>25</b>
<b>Figura 11.</b>	<b>Diagrama com os microrganismos isolados e submetidos à análise de produção de amilases e proteases extracelulares .....</b>	<b>26</b>
<b>Figura 12.</b>	<b>Perfil hidrolítico dos microrganismos.....</b>	<b>27</b>
<b>Figura 13.</b>	<b>Medida do Índice de proporcionalidade.....</b>	<b>28</b>
<b>Figura 14.</b>	<b>Perfil hidrolítico dos isolados da compostagem 28 (C28).....</b>	<b>29</b>
<b>Figura 15.</b>	<b>Teste quantitativo de formação de halo em placa, realizado em triplicata.....</b>	<b>30</b>
<b>Figura 16.</b>	<b>Índice gerado em experimento realizado em triplicata e cálculo da média e do desvio-padrão .....</b>	<b>31</b>
<b>Figura 17.</b>	<b>Características dos 44 isolados selecionados como melhores amilolíticos e/ou proteolíticos .....</b>	<b>32</b>
<b>Figura 18.</b>	<b>72 isolados analisados por espectrometria de massa em banco de dados biotyper</b>	<b>35</b>

<b>Figura 19.</b>	<b>Espectros gerados no processo de identificação por espectrometria de massa MALDI TOF-MS em duplicidade .....</b>	<b>36</b>
<b>Figura 20.</b>	<b>Curva de crescimento para os 9 isolados realizado em nonoplicata.....</b>	<b>37</b>
<b>Figura 21.</b>	<b>Quantificação de açúcar redutor pelo método DNS, que determina quanto de amido foi hidrolizado .....</b>	<b>38</b>
<b>Figura 22.</b>	<b>Quantidade de proteínas totais presente, determinada pelo método de Bradford..</b>	<b>39</b>
<b>Figura 23.</b>	<b>Atividade específica.....</b>	<b>40</b>
<b>Figura 24.</b>	<b>Atividade do isolado que apresentou a melhor atividade específica.....</b>	<b>41</b>
<b>Figura 25.</b>	<b>Macromorfologia dos nove isolados amilolíticos selecionados.....</b>	<b>42</b>
<b>Figura 26.</b>	<b>Perfil metabólico dos nove isolados.....</b>	<b>46</b>
<b>Figura 27.</b>	<b>Cluster de sequências multiplas.....</b>	<b>47</b>
<b>Figura 28.</b>	<b>Resumo de atividades .....</b>	<b>48</b>

## 1. Resumo

A Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP) possui uma Unidade de Produção de Composto Orgânico (UPCO) que recicla material orgânico, como: excremento de aproximadamente 3.500 animais (cerca de 400 espécies) oriundos de várias partes do mundo, cama de animais, resíduos de poda dos jardins do Parque Zoológico, restos vegetais da Mata Atlântica e resíduos alimentares. O composto final, cerca de 600 toneladas/ano, é utilizado como fertilizante orgânico na fazenda do Zoológico, para produção de cerca de 70% dos alimentos consumidos pelos animais do Parque, fechando assim um ciclo virtuoso de sustentabilidade. Além disso, a compostagem evita que a matéria orgânica seja depositada em aterros sanitários, o que causaria problemas ambientais. A riqueza microbiológica desse material é incalculável, visto que ali poderão ser encontradas espécies que ainda não foram descritas e/ou cultivadas, bem como espécies produtoras de enzimas de interesse industrial. Dentro de um acordo de parceria estabelecida entre a UNIFESP e a FPZSP, e dentro de colaboração com grupos de pesquisa do IQ-USP, este projeto de mestrado envolveu o isolamento de bactérias em meios de cultura ricos não seletivos provenientes de diferentes etapas de um processo de compostagem efetuado numa célula de compostagem da UPCO do Zoológico de São Paulo. Uma vez purificados e estocados no banco de microrganismos do LIMic (Laboratório de Interações Microbianas, Unifesp – Diadema), os isolados microbianos foram triados para aqueles secretores de amilase ou protease, seguido de caracterização taxonômica por espectrometria de massa (MALDI/TOF-MS). Nove isolados bacterianos secretores de amilases foram selecionados para estudo quanto à atividade da amilases secretadas em meio de cultura líquido, e tiveram respectivos fragmentos do 16SrDNA amplificados por PCR, sequenciados e submetidos a análise de sequências para caracterização taxonômica.

**Palavras-chave:** compostagem; microbiota; isolados bacterianos; amilase; protease.

## Abstract

The São Paulo Zoological Park Foundation (FPZSP) has a Unit for Production of Organic Compost (UPCO) that recycles organic waste, like fecal matters of about 3,500 animals (*circa* 400 species) coming from various parts of the world, litters, pruning waste from the Zoological Park gardens, plant debris of the Atlantic Forest and food waste. The final compost, about 600 tons per year, is used as organic fertilizer in the Zoo's farm, to produce about 70% of the feed consumed by the animals of the park, thus closing a virtuous cycle of sustainability. Moreover, composting prevents the organic matter to be deposited in landfills, which would cause environmental problems. The microbiological richness of that material is incalculable, since there one may find species that have not yet been described and/or cultured, as well as species that produce enzymes of industrial interest. In a partnership established between UNIFESP and FPZSP, and in a collaboration with IQ-USP research groups, this project covered the isolation of bacteria in nonselective rich culture media, from samples collected at different stages of a organic waste composting process achieved at the São Paulo Zoo's UPCO. Once purified and stocked at -80°C in ultrafreezer, the next step was the screening for isolates secreting amylase or protease, followed by taxonomical characterization using mass spectrometry (MALDI/TOF-MS) biotyping. Nine amylase secreting bacterial isolates were studied in more detail for activity of amylases secreted in medium culture, sequencing of a PCR amplified 16SrDNA fragment and Blast sequence analysis for taxonomical characterization.

**Keywords:** composting; microbiota; bacterial isolates; amylase; protease.

## 2. Introdução e Justificativa

A prática de compostagem de matéria orgânica descartada é uma forma eficiente de reciclagem e geração de produtos úteis, que de outra forma acabariam em aterros sanitários, com risco de contaminar o solo e o lençol freático. Este processo, decorrente da ação microbiana, permite a conversão de matéria orgânica biodegradável em adubo vegetal. Um processo típico de compostagem compreende uma sucessão de estágios em que populações de microrganismos vão colonizando a matéria em compostagem, ao longo do tempo, até a formação do composto final (Blanc et al., 1999; Dees & Ghiorse, 2001; Hansgate et al., 2005; Guo et al., 2007).

Este projeto foi fomentado dentro de um programa de prospecção de microrganismos presentes em compostagem, realizada na Unidade Produtora de Composto Orgânico (UPCO) da Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP), localizada em uma área de 900.000 m<sup>2</sup> de Mata Atlântica no município de São Paulo. A matéria orgânica processada na UPCO (2.000-2.500 kg/dia) tem várias origens, tais como: excrementos de aproximadamente 400 espécies (cerca de 3.500 animais) da fauna nativa e exótica, carcaças de animais, restos de cama de animais, resíduos alimentares e restos vegetais de poda dos jardins do parque e de plantas que compõem o fragmento de Mata Atlântica em que o parque está situado. Ao final do processo, a matéria orgânica é convertida em adubo, destinado à fertilização de áreas agrícolas da fazenda do Zoológico, onde são produzidos alimentos consumidos pelos animais do Parque, fechando assim um ciclo de sustentabilidade. O processo de compostagem desenvolvido e adotado pela FPZSP não gera odores nem proliferação de moscas ou outras pragas, não atrai animais sinantrópicos indesejáveis, recupera e preserva as condições ambientais no parque e reduz custos com transporte no descarte de resíduos e com a aquisição de adubos. Geralmente, a matéria orgânica é depositada na composteira de forma estratificada (por exemplo, estrume e matéria orgânica vegetal, alternadamente), observando-se proporções adequadas de carbono e nitrogênio (exemplo: 30C:1N), com aeração e umidificação apropriadas.

O material de compostagem da UPCO tem um potencial evidenciado para a prospecção de microrganismos que podem representar cepas produtoras de substâncias e compostos de interesses diversos, como amilases (Pascon et al., 2011), e ainda, com potencial para a descoberta de novas substâncias com propriedades antibióticas, citostáticas, inibidores enzimáticos, enzimas

(lignases, celulasas, proteases, outras), probióticos, antiparasitários, antifúngicos, produtos com atividades para o combate a doenças negligenciadas etc.

A compostagem implica na decomposição bio-oxidativa de matéria orgânica, efetuada por microrganismos (bactérias, leveduras, actinomicetos e fungos) que prevalecem ao longo do processo e levam a variações de temperatura e pH. Populações específicas de microrganismos aeróbicos, anaeróbicos e aeróbicos facultativos atuam no processamento das mais diferentes fontes de carbono ali existentes, das mais simples (mono e oligossacarídeos) até as mais complexas (celulose, lignina, pectina, amido, proteínas) (Blanc et al., 1999; Dees & Ghiorse, 2001; Guo et al., 2007; Hansgate et al., 2005; Peters et al., 2000; Gajalakshmi & Abbasi, 2008). Diferentes sistemas de compostagem são usados, podendo ser fechados (“reatores”), semiabertos ou abertos, estáticos ou não (Gajalakshmi & Abbase 2008; Fitzpatrick . 2005). Um processo típico de compostagem compreende uma série de estágios em que ocorre aumento de temperatura (até 70°C), manutenção de temperatura elevada por um período e resfriamento gradual do material compostado. Outros fatores, como gradiente de oxigênio, pH e disponibilidade de nutrientes, também variam durante o processo, gerando como subprodutos ácidos graxos voláteis, amônia, dióxido de carbono e ácidos húmicos.

No início da compostagem atuam bactérias mesófilas, fungos e protozoários, que crescem entre 10°C e 45°C, fase na qual ocorre a degradação de substâncias com estrutura química menos complexa. A ação oxidante desses microrganismos resulta em aumento de temperatura e queda do pH, causada pela formação de ácidos graxos voláteis, sendo que a degradação posterior destes resulta em subsequente aumento de pH e geração de amônia. Quando a temperatura eleva-se acima de 45°C, microrganismos termofílicos tomam o lugar dos mesofílicos na decomposição da matéria orgânica. A maior parte da celulose é degradada nesta etapa e, conseqüentemente, mais oxigênio é consumido. A produção de lignina também começa nesta fase (Fialho et al., 2010). Após a fase termofílica, que corresponde ao pico de degradação da matéria orgânica fresca, a atividade microbiana diminui, assim como a temperatura, quando, então, os microrganismos mesofílicos colonizam a compostagem e lentamente inicia-se a degradação de compostos orgânicos com estrutura química mais complexa, como a lignina. Nesta última fase, são produzidas as substâncias húmicas para formar o “composto” maduro (Gajalakshmi & Abbasi, 2008; Haug, 1993). Uma combinação de variáveis afeta as populações microbianas presentes na compostagem, estabelecendo, assim, um mecanismo de retroalimentação entre os sistemas biótico e abiótico, o que certamente impacta na estrutura da comunidade microbiana habitando o



substrato orgânico. Além disso, é plausível supor que as populações microbianas variem dependendo dos substratos e das condições em que é realizada a compostagem (Alfreider et al., 2002; Blanc et al., 1999; Dees & Ghiorse, 2001; Guo et al., 2007).

Diante das altas temperaturas que o material atinge durante a compostagem, é plausível esperar que diversos tipos de microrganismos mesofílicos e termofílicos se sucedam nesse ambiente e que sejam capazes de se proliferar e decompor a matéria orgânica disponível. É sabido que organismos que vivem em condições rigorosas de temperatura, osmolaridade etc., também são capazes de explorar uma variedade grande de fontes poliméricas de carboidratos e outras moléculas orgânicas energéticas, pela ação de enzimas hidrolíticas (Blumer-Schuette et al., 2008). Novas fontes de enzimas microbianas podem ter significativa aplicação industrial e biotecnológica, como aquelas que conseguem atuar em condições extremas de temperatura, pH, solventes orgânicos, com potencial para alternativa em química verde de processos industriais, nos quais essas enzimas poderiam substituir etapas químicas tradicionalmente geradoras de mais efluentes tóxicos a serem tratados, consumidoras de mais energia ao longo do processo, sobretudo em indústrias têxteis, de tratamento de couro e alimentícia. (Akcan, N.; Uyar, F.; Güven, A., 2011; Muñoz, J.; Quintero, M.; Gutiérrez, P. A., 2011; Ackan, N., 2011).

A revisão da literatura relativa a este assunto revela que a diversidade e dinâmica da comunidade microbiana têm sido investigadas durante o processo de compostagem de diferentes tipos de substratos (exemplos: resíduos orgânicos domésticos, resíduos industriais, material vegetal de poda de jardins e material vegetal residual de práticas agrícolas) por meio de diversas abordagens, que incluem, além de cultivo e isolamento de microrganismos, identificação principalmente a partir do sequenciamento dos genes de rRNA 16S e do espaçador interno transcrito (ITS) de rRNA (Bibby et al., 2010; Allgaier et al., 2010; Partanen et al., 2010; Hultman et al., 2010; Alfreider et al., 2002; Blanc et al., 1999; Haruta et al., 2004; LaMontagne et al., 2002; Reuter et al., 2009; Viau & Peccia, 2009; Jaenicke et al., 2011; Krause et al., 2008). Os resultados destes trabalhos, como esperado, revelam a variação da comunidade microbiana ao longo do processo de compostagem. Alguns trabalhos analisaram a dinâmica e a estrutura das populações de microrganismos em diversos estágios da compostagem em substratos diversos, utilizando o sequenciamento do DNA codificando o 16S rDNA de procarioto (Blanc et al., 1999; Kowalchuk et al., 1999; Peters et al., 2000; Dees & Ghiorse 2001; Alfreider et al., 2002; Haruta et al., 2004; Hansgate et al., 2005; Schloss et al., 2005; Tiquia et al., 2005; Guo et al., 2007; Franke-Whittle et al., 2009).

O processo de isolamento de microrganismos utilizando meios sólidos ricos constitui-se numa metodologia capaz de possibilitar a avaliação da fração dos microrganismos cultiváveis que colonizam substratos orgânicos, sendo que estimativas atuais apregoam que cerca de 99% dos microrganismos da biodiversidade do planeta não é cultivável em meios de cultura e condições experimentais estabelecidas (LINS, U. et al. 2003). Além de avaliar a diversidade microbiológica, é muito importante estabelecer, organizar e preservar uma coleção de isolados que sirva como recurso genético, a partir do qual se possa manipular microrganismos para cultivo e estudos de fisiologia, genética, microbiologia e biologia molecular destes. A criação de um banco de microrganismos isolados em condições apropriadas (ex., em ultrafreezer a -80°C) abre a possibilidade de manipulação e estudos diversos posteriores, como manipulações genéticas, microbiológicas e outras, promovendo sua propagação (Bitencourt et al., 2010; Pascon et al., 2011; Oliveira, Paula, 2012; Podesta et al., 2013; Cipriano, M. A. P.; Patricio, F. R. A.; Freitas, S. S. 2013; Vasconcellos, R. L. F. de et al. 2010).

Após o isolamento e a estocagem de microrganismos cultiváveis o primeiro passo para se estabelecer esta coleção é caracterizá-la. Para a identificação taxonômica de isolados bacterianos uma alternativa tradicional ao sequenciamento e análise do DNA codificando o rRNA 16S é a tecnologia que envolve espectrometria de massa. Aparelhos do tipo MALDI-TOF-MS (*matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry*) permitem a tipagem de microrganismos, contribuindo para sua classificação e a discriminação entre indivíduos de mesma espécie, com baixo custo operacional, rapidez, confiabilidade dos resultados e necessitando de quantidades discretas de material biológico, além da capacidade de ser aplicada em larga escala. A biotipagem de microrganismos por espectrometria de massas surgiu com o trabalho de Fenselau (1994), em decorrência de desenvolvimentos técnicos na área de espectrometria de massa. Outra vantagem do MALDI-TOF-MS é a possibilidade de se utilizar células intactas de microrganismos, que podem ser retiradas diretamente das colônias que crescem em meio de cultura sólido, acelerando a análise.

Com a utilização de células lisadas na preparação de amostra para a espectrometria de massa (também designada ICM-MS, *intact cell* MALDI-TOF-MS) é produzido um espectro de proteínas presentes em cada espécie microbiana, cujo perfil pode ser comparado aos espectros previamente identificados e depositados em bancos de dados (Claydon et al., 1996; Walker et al., 2002; Marvin et al., 2003; Vargha et al., 2006). A tecnologia de espectrometria de massas para a biotipagem de microrganismos tem tido crescente aplicação em laboratórios de análises clínicas

e com potencial para aplicabilidade em microbiologia de alimentos e industrial, ou seja, utilidade em setores que exijam controle microbiológico e cujos resultados sejam requeridos em curtos espaços de tempo e de maneira confiável (Marvin et al., 2003; Hsieh et al., 2008). Embora os bancos de espectros de massas de isolados microbianos disponíveis, como o da Bruker Daltonics, ainda contenham majoritariamente dados de isolados clínicos, uma tendência é o enriquecimento destes bancos de dados com espectros característicos de isolados microbianos de origem ambiental. Na última década, diversos trabalhos envolvendo prospecção de microrganismos tiveram como nichos ecológicos de isolamento ambientes extremos como águas termais, gêiseres, vulcões, geleiras, reservas de óleo combustível etc. (Demirjian et al., 2001). Estes organismos ditos extremófilos podem servir de base para o estudo e a caracterização de “extremozimas”, assim designadas devido ao alto grau de estabilidade, uma vez que atuam em condições adversas, como altas temperaturas, alta salinidade, meios ácidos etc. A alta estabilidade, na maioria das vezes, traduz-se em robustez, o que é uma característica muito desejada em processos industriais que, muitas vezes, operam em condições que se assemelham às de ambientes extremos.

O mercado brasileiro de enzimas industriais e especiais foi avaliado em 147,2 milhões de dólares (3,7% do mercado mundial) no ano de 2005, com 86% deste montante correspondendo a importações (126,6 milhões) e 14% a exportações (20,6 milhões). O uso de enzimas em processos de catálise industrial como substituição a métodos químicos tradicionais representa economia de energia e menor geração de poluentes, conferindo valor agregado a produtos obtidos a partir de fontes renováveis e biocatalisadores (Bon, 2008).

Neste projeto, trabalhou-se no isolamento de bactérias de diferentes momentos de um processo de compostagem de matéria orgânica ocorrido a altas temperaturas, e, a partir destes isolados bacterianos, procedeu-se a seleção daqueles produtores de amilases e proteases, com posterior foco em bactérias amilolíticas selecionadas. As proteases ocupam 60% do mercado mundial de enzimas, devido a sua ampla aplicação em diferentes atividades industriais, como processamento de alimentos e bebidas, formulação de detergentes, produção de medicamentos, produção de couro, entre outras (Banerjee, 1999). As amilases podem ser utilizadas nas indústrias alimentícia, têxtil, de bebidas alcoólicas e sucos de frutas, de papel e celulose, química, produtos de limpeza, entre outros (Bon, 2008).

### **3. Objetivos**

O objetivo geral deste trabalho foi isolar e caracterizar bactérias de diferentes etapas de uma compostagem de matéria orgânica descartada na Unidade Produtora de Composto Orgânico (UPCO) da Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP).

#### **3.1 Objetivos específicos**

- Isolar e estocar bactérias presentes em diferentes estágios de compostagem de matéria orgânica na UPCO da FPZSP.
- Triar os isolados bacterianos para aqueles produtores de amilases e proteases.
- Caracterizar os microrganismos isolados segundo macro morfologia de colônia, produção de halo de degradação de amido e/ou caseína (proteína do leite) em placa com meio de cultura sólido, e coloração de Gram.
- Calcular o índice de proporcionalidade do diâmetro do halo em relação ao diâmetro da colônia, evidenciando os melhores secretores de amilases e proteases.
- Aferir a atividade de amilase secretada por isolados selecionados, em meio de cultura.
- Caracterização taxonômica dos isolados selecionados.

## **4. Material e Métodos**

### **4.1. Coleta de amostras de compostagem**

As amostras foram coletadas de uma composteira padrão, constituída de serragem, folhagens da Mata Atlântica, dejetos de animais, folhas e pelagem adquiridos na limpeza de ninhos e tocas, ossos e resto de frutas provenientes da alimentação dos animais da FPZSP – mantendo uma proporção entre carbono e nitrogênio de 30:1. Carcaças de animais oriundos do FPZSP que morreram não foram adicionadas nessa composteira. Com o auxílio de um trado, conforme padronizado por Bitencourt et al. (2010), foram feitas coletas em cinco locais distintos da composteira, com tomadas da temperatura efetuadas a cerca de 1,20 metro de profundidade imediatamente antes da coleta no mesmo local. Cada massa de compostagem coletada, correspondendo a aproximadamente 300 gramas de amostras de cada local de coleta, contendo os microrganismos e compostos orgânicos ali presentes, sendo objeto de estudo neste trabalho, foi homogeneizada com o auxílio de uma espátula, acondicionada em sacos plásticos estéreis e transportada dentro de caixa de isopor até o laboratório. Em seguida, as amostras foram pesadas, tiveram o pH medido, utilizando-se uma fita de pH, e separadas em quatro frascos do tipo Falcon de 50 ml, para armazenamento em geladeira a 4°C e freezers a -20 °C, para amostras frescas, e -80 °C, para amostras que foram previamente liofilizadas. A água utilizada na diluição das amostras foi obtida de um destilador de osmose reversa e autoclavada em autoclave vertical, por 20 minutos, a uma temperatura de 121 °C.

### **4.2. Preparo dos meios de cultura**

Foram preparados os seguintes meios de cultura, com tais composições:

- *Ágar Nutriente (AN) marca Himedia (ref. M001-500g)®*. Para 1 litro: 5 g de digestão péptica de tecido animal, 1,5 g de extrato de carne bovina, 1,5 g de extrato de levedura, 5 g de cloreto de sódio e 15 g de ágar.
- *R-2A Agar, Para 1 litro*: 0,5 g de caseína ácida hidrolisada, 0,5 g de extrato de levedura, 0,5 g de peptona protease, 0,5 g de dextrose, 0,5 g de amido solúvel, 0,3 g de fosfato de dipotássio, 0,024 g de sulfato de magnésio, 0,3 g de piruvato de sódio e 15 g de ágar.
- *BHI (Brain Heart Infusion) marca Himedia ref. M21 litro 11-500g®*. Para 1 litro: 200 g de perfusão de cérebro de bezerro, 250 g de infusão de coração bovino, 10 g de peptona, 2 g de dextrose, 5 g de cloreto de sódio, 5 g de fosfato dissódico e 15 g de ágar.

- *Luria Bertani (LB) marca Bio Basic inc. produto S518 ®. Para 1 litro: 10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura, 10 g de NaCl e 15 g de ágar.*

- *Amido Agar, 1 litro de meio de cultura com amido solúvel para atividade amilolítica para bactérias: 6 g de peptona, 0,5 g de  $MgSO_4 \cdot H_2O$ , 0,5 g de KCl, 10 g de amido solúvel e 20 g de ágar.*

- *Caseína Agar, 1 litro de meio de caseína para identificação de microrganismos proteolíticos: 1 g de extrato de levedura, 5 g de caseína, 7 g de  $KH_2PO_4$ , 2 g de  $K_2HPO_4$ , 0,1 g de  $MgSO_4$ , 5 g de NaCl e 15 g de ágar.*

#### 4.3. Diluição seriada

Cada suspensão de composto em solução salina NaCl 0,9%, com as amostras coletadas ao longo do processo de compostagem, foi submetida a diluições seriadas e plaqueamento em meio de cultura sólido, visando ao isolamento de microrganismos cultiváveis presentes nas amostras. As diluições foram realizadas pela transferência de 1ml da suspensão inicial para um novo tubo estéril contendo 9 ml de solução salina, gerando a diluição  $1 \times 10^{-1}$ .

O processo foi repetido novamente, de forma sequencial, levando à obtenção das diluições  $1 \times 10^{-2}$ ,  $1 \times 10^{-3}$ ,  $1 \times 10^{-4}$ ,  $1 \times 10^{-5}$  e  $1 \times 10^{-6}$  (Figura 2). De cada tubo da diluição seriada, foi coletada uma amostra, com uma pipeta automática da marca Eppendorf e com uma ponteira de 200 µl descartável e estéril, e espalhada em placa de Petri contendo meios de cultura seletivos (ACT e MRS) e não seletivos (TSA, BHI, AN, R2A).

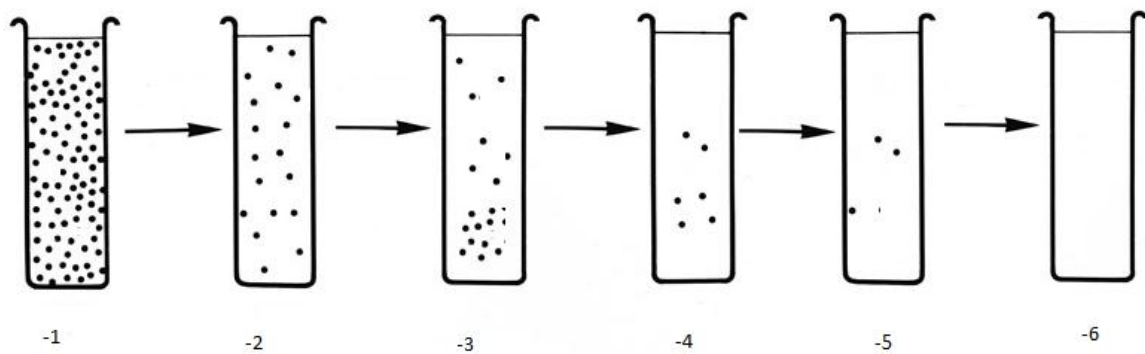


Figura 1. Diluição seriada (1/10) de suspensão contendo amostra de compostagem.

#### **4.4. Isolamento e preservação de microrganismos cultivados**

Os microrganismos que formaram colônias foram isolados com o uso de meios de cultura em ágar não seletivos, capazes de favorecer o crescimento de bactérias em geral – BHI, R2A, Ágar Nutriente – a 30 °C em incubadora. Após o crescimento inicial, estes foram repicados nos mesmos meios em que colônias isoladas pela técnica de estriamento foram obtidas. As colônias isoladas foram repicadas em tubos de vidro contendo meio de cultura líquido LB e incubadas sob agitação constante a 30°C por 24hs ou até o líquido apresentar turbidez. Das culturas que apresentaram turbidez em meio líquido foi transferido 1ml para tubos criogênicos de 2 mL, com a identificação dos isolados, acrescentando-se em seguida 230µl de glicerol estéril, resultando numa suspensão de bactérias em solução contendo glicerol a 15%, em seguida estocados em caixas e estocados em ultrafreezer a -80°C. Cada isolado foi estocado em duplicata e armazenado em dois ultrafreezers distintos.

#### **4.5. Seleção de microrganismos produtores de amilases e proteases**

O método classicamente utilizado para identificar microrganismos secretores de amilases é o de identificação de halo de degradação de substrato específico. Foi utilizado uma metodologia padronizada por Pascon *et al.*, (2011) no laboratório, envolvendo meio de cultura sólido com amido solúvel para detecção da atividade amilolítica em bactérias (Pascon *et al.*, 2011). A visualização do halo de degradação do amido foi possível após exposição das placas contendo colônias bacterianas ao cristal de iodo, composto volátil que se complexa com o amido formando uma coloração homogênea azul, exceto no halo de degradação do amido, na circunjunção das colônias secretoras de amilase.

Os microrganismos secretores de proteases foram triados igualmente por produção de halo de degradação em placas de Petri com meio sólido, porém em meio de cultura contendo caseína não hidrolisada como principal fonte de carbono, sendo observada a formação de halo de degradação de coloração esbranquiçada, que caracteriza a ação proteolítica sobre caseína em meio de cultura sólido.

O teste de produção do halo de degradação é realizado a partir de uma amostra de cada colônia isolada, recolhida com o auxílio de um palito de dente estéril, e num pequeno espaço na superfície do meio de cultura em placa contendo amido ou caseína hidrolisada, uniformizando-se o tamanho do inóculo, seguido de incubação em estufa por períodos de 24, 48 e 72 horas, em

função do tempo de crescimento dos isolados (determinado anteriormente, na etapa de isolamento). As placas foram registradas em fotos digitais e catalogadas em planilhas que compõem o banco de dados do projeto.

#### **4.6. Quantificação de halo de degradação em placa de amido ou caseína**

A partir de imagens fotográficas de colônias dos isolados que formaram halo de degradação no teste de amilolíticos e proteolíticos, foram medidos os diâmetros das colônias e dos halos de degradação com o auxílio de uma régua, para o cálculo do índice de proporcionalidade halo/colônia. Para esse experimento, foram utilizados dois controles positivos em cada placa: *Bacillus subtilis* para amilolíticos, e *Bacillus cereus* BCHMAC21 para proteolíticos fornecidos por Pascon, Laboratório de Interação Microbiana (LIMic 29) campus Diadema, Eldorado. Colônias de microrganismos que passaram pela triagem de produção de halo de degradação em placa foram selecionadas, e as que não apresentaram essas características permanecem estocadas a -80 °C, devidamente catalogadas para estudos posteriores.

Para os microrganismos que apresentaram halo de degradação em placa, utilizou-se o método descrito por Pascon e colaboradores (2011) para o cálculo de proporcionalidade entre o diâmetro do halo e o diâmetro da colônia, considerando o isolado apresentando maior índice como melhor produtor. Para isso, levou-se em consideração o número do índice de proporcionalidade elevado, o período de compostagem em que foi coletada a amostra e o tempo de crescimento em placa. Para os selecionados nesta etapa fez-se novo ensaio, agora em triplicata, para calcular o índice de proporcionalidade e o desvio padrão para cada isolado sob estudo nesta etapa. Neste experimento, utilizaram-se os mesmos controles do experimento inicial de medida do halo de degradação, com o controle inserido em cada lote de placas.

#### **4.7. Coloração de Gram**

Os melhores secretores de amilase e protease foram submetidos a um teste de coloração de Gram e visualização em microscópio óptico para caracterizar isolados Gram positivos ou negativos e caracterização das formas micromorfológicas. Os testes de Gram foram realizados com o kit (conjunto para coloração de Gram Laborclin), seguindo-se as instruções do fabricante, que permite colorir com violeta genciana os microrganismos Gram-positivos, e com rosa fucsina, os Gram-negativos.



#### **4.8. Caracterização de isolados por espectrometria de massa (MALDI TOF-MS) e sequenciamento do genes 16S rRNA**

Os isolados bacterianos foram crescidos em placa de Petri contendo meio LB sólido, e a partir de uma massa de células de um dado isolado procedeu-se à extração de proteínas visando a identificação por espectrometria de massas. Uma pequena quantidade de material biológico, correspondente a uma única colônia fresca foi coletada e adicionada em um tubo Eppendorf de 2 ml, adicionado de 300 µl de água destilada e levado ao vórtex até completa suspensão das células. Em seguida foram adicionados à amostra 900 µl de álcool anidro 99,6%, sendo, depois, novamente homogeneizado em vórtex, até completa dissolução. Após centrifugação por 2 minutos a 15.000 rpm o sobrenadante foi descartado e o precipitado (*pellet*) no Eppendorf foi secado ao ar. Após, adicionou-se 50 µl de ácido fórmico 70% e dissolveu-se no *pellet* em vórtex, seguido de 50 µl de acetonitrila e homogeneização para, em seguida, 1 µl da preparação ser depositada em poços na superfície da placa de leitura dos espectrômetros de massas MALDI TOF-MS Microflex ou Ultraflex da Bruker Daltonics, na sequência da preparação recoberta com 1 µl de uma matriz de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinamico. Após a secagem foi realizada a aquisição dos espectros. A amplitude dos espectros úteis para identificação de microrganismos é de 2.000 a 20.000 KDa. As análises dos espectros obtidos foram realizadas com o software MALDI Biotyper 2.0 (Bruker Daltonics), desenvolvido para o processamento dos dados originários de espectros de identificação de microrganismos, bem como para classificação e comparação dos espectros gerados. Um valor (*score*) é gerado de acordo com a similaridade ao banco de espectros da Bruker com valores entre 0,000 e 1,699 para amostras não identificadas, entre 1,700 e 1,999 para identificação de provável gênero, entre 2,000 e 2,299 resulta em confirmação do gênero e provável espécie e score entre 2,300 e 3000 confirmação de gênero e espécie.

Para o sequenciamento do DNA codificando o rRNA 16S bacteriano dos nove isolados selecionados foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores S-17: 5'- CCT ACG GGN GGC WGC AG -3' e A-21: 5'- GAC TAC HVG GGT ATC TAA TCC -3', onde N = A+T+C+G, W = A+T, H = A +C+ T e V = A+C+G (Klindworth A. *et.al.* 2013) na amplificação de um fragmento de DNA codificando o rRNA 16 dos isolados bacterianos, em reações de PCR (programa: 95°C - 10' uma vez; 95°C - 40", 55°C - 1', 72°C - 1' trinta e cinco ciclos; 72°C - 7', e 40C até a análise por eletroforese em gel de agarose a 1%. Os amplicons obtidos foram respectivamente isolados do gel com o QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN) e enviados em gelo seco, pelo correio, para sequenciamento no CREBIO - Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica da UNESP-Campus Jaboticabal. As sequências

retornadas foram submetidas a análise de sequência no GenBank com o algoritmo blastn.

#### **4.9. Curva de crescimento dos isolados amilolíticos**

Para quantificar a capacidade de cada microrganismo se multiplicar em meio de cultura líquido, cada isolado foi inoculado em erlenmeyer de 250mL contendo 50ml meio de cultura LB numa OD de 0.3 a 600nm, em triplicata, com incubação a 39° C e agitação constante de 150 rpm, nos tempos zero, 2hs, 4hs, 6hs, 16hs, 18hs, 24hs e 26hs foram coletadas alíquotas de 5ml de cultura, e 0.5 ml foram submetidos a leitura de OD em espectrofotômetro (Bell Photonics 2000UV). Os 4,5 ml restantes foram centrifugados e o sobrenadante foi e armazenado a -20°C para experimentos de quantificação de proteínas; Bradford e de quantificação de atividade amilolítica em sobrenadante de culturas.

#### **4.10. Quantificação de atividade amilolítica em sobrenadante de culturas**

Para o preparo de um litro da solução de DNS utilizamos: Água 944ml, Acido-35-Dinitrosalicílico 7,06g, Hidróxido de sódio 13,2g em um Becker levado a um agitador magnético até completa dissolução e, após dissolver, adicionamos Tartarato de Sódio 204g, Fenol 5,06ml (aquecido), Metabissulfito de Sódio 5,52g. Para cada frasco de DNS fez-se necessário o preparo de uma nova curva de calibração.

Para a interpretação da absorbância adquirida na leitura das amostras em quantidade de açúcar obtido, criamos uma escala com quantidades de açúcar conhecida (DNS) fizemos uma solução estoque de 10mg/ml de D-Glicose (sigma) em tampão Citrato de Sódio 50mM pH 4,5 e em triplicata com tubos de ensaio de vidro adicionamos a solução estoque de 10mg/ml de D-Glicose, tampão citrato de Sódio 50mM pH 4,5, água e DNS nas quantidades mostradas na Figura 2, fervemos os tubos a 100°C por 5 minutos e completamos o volume para 10ml com água destilada milliQ, que em uma cubeta de plástico foram analisadas por espectrofotometria a uma absorbância de 550nm, nos dando a referência da conversão do valor de absorbância respectivo à quantidade de açúcar.

Tubos de ensaio em triplicata	µg de açúcar	µl de glicose (10mg/ml)	ml de tampão NaOAc 50mM pH 4,5	ml de H2O	ml de DNS
A	0	0	1,0	0,500	3,0
B	50	10	1,0	0,490	3,0
C	100	20	1,0	0,480	3,0
D	200	40	1,0	0,460	3,0
E	300	60	1,0	0,440	3,0
F	400	80	1,0	0,420	3,0
G	500	100	1,0	0,400	3,0
H	600	120	1,0	0,380	3,0
I	700	140	1,0	0,360	3,0
J	800	160	1,0	0,340	3,0
K	900	180	1,0	0,320	3,0
L	1000	200	1,0	0,300	3,0
M	1200	240	1,0	0,260	3,0

**Figura 2. Curva de calibração para a solução de Acido Dinitrosalicílico.**

O método foi utilizado para quantificar a atividade amilolítica pela dosagem de açúcar redutor; Procedemos fazendo uma solução de 1% de amido preparado em tampão NaOAc (tampão acetato) 50mM em pH 5,6 ajustado com ácido acético, dispensados em tubos de ensaios de vidro um volume de 1 ml da solução. Com uma cultura do microrganismo em meio líquido obtida nos tempos de coleta da curva de crescimento descrita anteriormente, Adicionamos 0,5ml do sobrenadante da cultura do microrganismo ao tubo com a solução de amido em tampão de NaOAc e incubamos por 15 minutos à 90°C em banho maria. Passados os 15 minutos, aguardamos esfriar os tubos a temperatura ambiente e adicionamos 3ml de DNS em cada um dos tubos e fervemos a 100° C por 5 minutos. Passado o tempo retiramos os tubos do banho e resfriamos a temperatura ambiente, completamos o volume para 10ml com água destilada milliQ e medido a absorbância a 550 nm. Para a análise por espectrofotometria foi necessário criar para cada amostra uma alíquota denominada branco e esse deve ser feito seguindo os mesmos passos para o preparo das amostras, porém deve ser suprimido o passo de incubação em banho maria por 15 minutos à 90° C, para ser caracterizado como branco, toda a reação, exceto a quantidade de açúcar redutor .

#### **4.11. Bradford**

Fizemos uma análise baseada no método de Bradford que quantifica a proteína total presente na amostra, e procede-se coletando uma pequena quantidade do sobrenadante de amostras obtidas no experimento de curva de crescimento que através de análise colorimétrica, caracterizada por espectrofotometria, expressa um dado numérico, resultado da quantidade de proteína presente na amostra quando comparado com uma curva padrão onde os valores de

proteínas são conhecidos. Com a adição de um corante de *coomassie brilliant Blue BG-250* que interage com os aminoácidos das proteínas e na forma aniônica se adsorvem fortemente em 595nm.

#### **4.12. Testes bioquímico-metabólicos com isolados bacterianos**

Para esta análise foi utilizado um painel de análise de perfil bioquímico-metabólico da Probac do Brasil. O painel é constituído por 25 provas que através das alterações de pH, hidrólise dos substratos e produção dos produtos metabólicos que são diagnosticados por alteração da cor e comparadas com uma tabela expressando o resultado em positivo ou negativo pra cada reação. O kit consiste dos substratos desidratados das provas distribuídos em microplaca, e para a realização do experimento foi necessário crescer os microrganismos em meio de cultura solido não seletivo e turvar com uma quantidade de amostra de 3 a 4 ml em solução inoculante Probac do brasil® que acompanha o kit na escala de 0,5 McFarland e distribuído aos poços da placa 100µl dessa turvação e óleo mineral estéril em alguns poços específicos e incubar a uma temperatura de 35°C ± 2°C de 18 a 24hs. Para obtenção dos resultados outros compostos como Reativo de Kovacs, Hidroxido de potássio 40%, alfa-naftol 5% e cloreto férrico 10% que acompanham o kit, também são necessários serem acrescentados em alguns poços para obtenção do resultado. [http://www.probac.com.br/bulas/painel\\_enterobacterias.pdf](http://www.probac.com.br/bulas/painel_enterobacterias.pdf)

##### **4.12.1. Produção de Indol**

Bactérias que possuem a enzima triptofanase em meio contendo triptofano, produzem indol, que é um dos produtos da degradação imediata da desaminação do triptofano, que pode ser detectado por teste colorimétrico com a adição de reativo de Kovacs.

##### **4.12.2. Voges Proskauer**

Por meio do metabolito gerado por degradação da glicose e caracterizado por seus produtos finais, ácidos como: ácido láctico, acético e fórmico; ou produtos finais neutros como: acetil, metil e carbinol, podendo sugerir em qual via metabólica a glicose foi degradada no microrganismo, e pode ser reconhecida pela adição de hidróxido de potássio e alfa naftol em um meio com indicador para evidenciar a presença de produtos finais neutros.

#### **4.12.3. Citrato de Simmons**

Em meio de cultura contendo como única fonte de carbono o citrato, é demonstrado se o microrganismo apresenta crescimento degradando o citrato.

#### **4.12.4. Sulfeto de hidrogênio**

Detecta a capacidade de o microrganismo liberar enzimaticamente enxofre inorgânico, como compostos de sulfeto de hidrogênio.

#### **4.12.5. Ureia**

Verifica a presença da enzima urease que hidrolisa a ureia.

#### **4.12.6. Triptofano desaminase**

Teste de diferenciação entre bacilos gram negativos e urease positivos, baseado na capacidade de produção de ácido indolpiruvico pelos microrganismos, que é detectada pela adição de cloreto férrico caracterizando a desaminação do triptofano em ácido indolpiruvico.

#### **4.12.7. Aminoácidos Lisina, Arginina e Ornitina**

Utilizando a base Moeller e demonstrando a descarboxilação do aminoácido em amina pelo microrganismo caracterizado pela alcalinidade do meio.

#### **4.12.8. Malonato**

Em meio de cultura tendo como única fonte de carbono o malonato, demonstra se o microrganismo apresenta crescimento degradando o malonato.

#### **4.12.9. Hidrólise da esculina**

Pelo escurecimento do meio em uma cor enegrecida, demonstra a capacidade do microrganismo hidrolisar a esculina.

#### **4.12.10. Fermentação de açúcares**

A formação de ácidos resultantes da fermentação de açúcares causa uma alteração da cor devido a diminuição do pH.

#### **4.12.11. Fermentação da lactose**

Caracteriza fermentação da lactose baseado na atividade da  $\beta$ -D-galactamase, que é uma das enzimas que determina a capacidade da bactéria fermentar lactose.

#### **4.12.12. Oxidase**

Bactérias produtoras da enzima oxidase apresentam um sistema de transporte de elétrons, denominado sistema citocromo oxidase, que na presença de oxigênio atmosférico, são oxidados pela citocromo oxidase, formando um composto colorido.

## 5. Resultados e discussão

Há mais de meio século os pesquisadores vêm estudando enzimas para o interesse industrial, pesquisando em plantas a  $\beta$ -amilase, o que vêm atendendo o mercado parcialmente pois não é resistente ao calor e ocorre desnaturação a temperaturas acima de 70°C, uma vez que hoje em dia a indústria busca por uma amilase mais robusta que resista a condições extremas, pesquisas estão sendo feitas em cima de  $\alpha$ -amilase, proveniente de microrganismos e resistente a temperaturas mais elevadas (AJAYI, A. O. ; FAGADE, O. E., 2007)

Um grande número de estudos relacionados a  $\alpha$ -amilase, demonstram que bacillus, em especial o subtilis, vêm sendo estudado com muita ênfase, devido a ser um microrganismo resistente a altas temperaturas e produzir amilase termo resistente, que é o foco principal deste trabalho, devido ao grande interesse da indústria por tal enzima (RIAZ et al., 2003),

Em paralelo, outros pesquisadores vêm estudando matéria orgânica do Jardim Zoológico de São Paulo tanto na compostagem quanto em outros ambientes como o lago e a microbiota de animais como o bugio (MARTINS et al 2013; LEÃO et al 2013).

O processo de compostagem do Zoológico de São Paulo, além de reciclar grande quantidade de matéria orgânica, proporciona o estudo de microrganismos e possui um grande potencial para prospecção de microrganismos, pesquisando uma composteira em cinco tempos de coleta, atingindo todo o processo de compostagem, temos que a macro morfologia dos isolados e a temperatura da composteira se diferenciam de acordo com cada coleta, como já era esperado.

O processo de compostagem ocorre naturalmente, mas pode ser manipulado como uma biotecnologia voltada ao reaproveitamento de matéria orgânica descartada. Aspectos como as características físico-químicas do processo de compostagem vêm sendo objeto de estudo no sentido de aperfeiçoar o processo bio-oxidativo (VanderGheynst J.S. et al. 1997; Higgins C.W. e Walker L.P, 2001). Outros parâmetros relacionados à diversidade microbiana ao longo da compostagem vêm sendo objeto de estudo e têm acompanhado a evolução das técnicas de biologia molecular e genômica. Estudos da variabilidade de micro- organismos implicados em compostagem por técnicas eletroforéticas (DGGE, PLFA, RFLP e SSCP) são capazes de revelar grupos de microrganismos mais abundantes enquanto estratégias utilizando o sequenciamento e análise do 16SrDNA pode identificar grupos menos representados mas que compõem a diversidade microbiana (Bent S.J. e Forney L.J. 2008). As tecnologias disponíveis atualmente para o sequenciamento de alto desempenho de DNA (NGS, next generation sequencing) vêm ampliar ainda mais a capacidade de aprofundar estudos sobre a dinâmica populacional de microrganismos ao longo de processos de compostagem.

### **5.1. Coleta de amostras de compostagem na UPCO do Zoológico de São Paulo**

Uma composteira foi especialmente montada na UPCO do Zoológico de São Paulo, para que amostras fossem coletadas ao longo do processo de compostagem (Figura 3). Na composteira (C28) não foi incluída carcaça de animais, e apresenta uma proporção de 30 carbono:1 nitrogênio, representando, portanto, um processo padrão de degradação de compostos orgânicos do parque zoológico, sendo um processo que leva em média 90 dias do início até a obtenção do composto final (adubo). Diariamente, foram tomadas medidas de temperatura da composteira C28, em cinco pontos diferentes, e foi calculada a média de cada dia (dados não mostrados), sendo que a medida de temperatura mais alta (73,2 °C) foi alcançada após a revira.

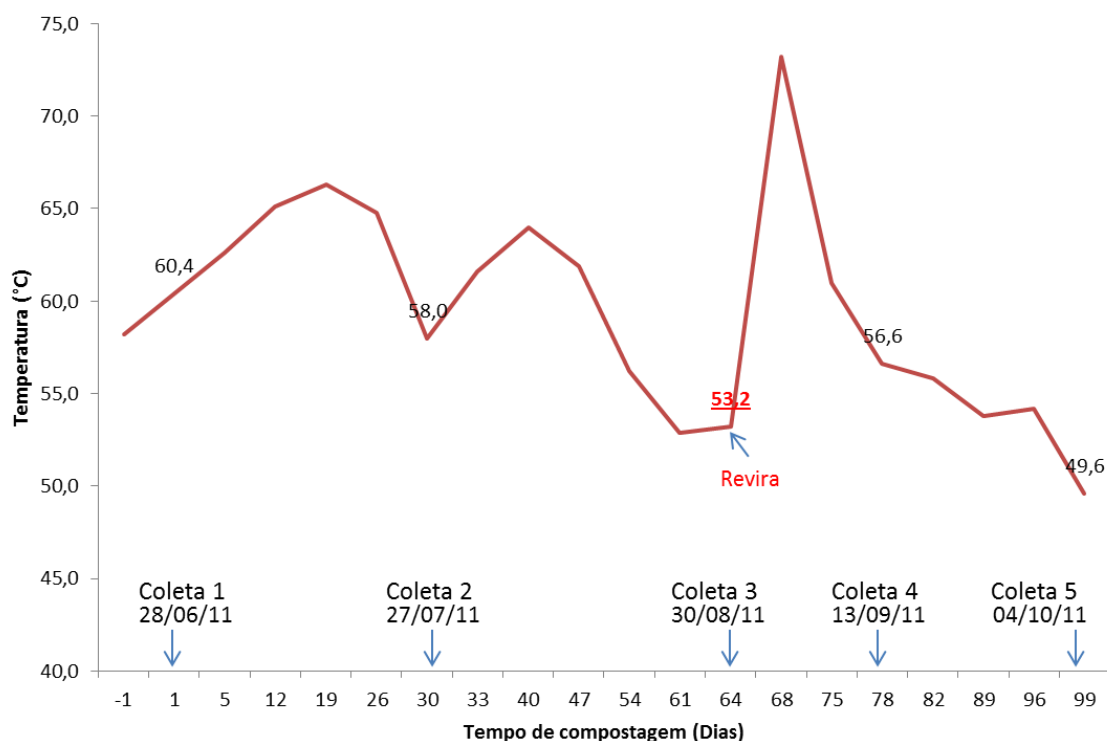
A primeira coleta foi realizada em 28 de junho de 2011, um dia após a composteira ter sido montada, e um mês depois, em 27 de julho, foi realizada a segunda coleta. A terceira coleta ocorreu em 30 de agosto, um dia antes da revira do material da composteira. A quarta coleta foi efetuada em 13 de setembro, e a quinta coleta, ao final do processo de compostagem, em 4 de outubro. O perfil do processo de compostagem, com a variação de temperatura em função do tempo, pode ser visualizado na Figura 4.

Depois de coletadas, as amostras foram levadas ao laboratório para iniciar o cultivo e o isolamento dos microrganismos. A cada amostra, foi adicionada uma solução salina estéril, NaCl a 0,9%, em tubos de ensaio estéreis, numa proporção de 10 gramas de composto para 5 ml de solução salina, seguido de medição de pH na suspensão com o auxílio de fita apropriada a esta finalidade (Papel indicador universal – tiras especiais pH 0 – 14.0 MERCK ref. 1095350001). Ao longo do processo de compostagem, o pH variou entre 5 e 6.



**Figura 3. Coleta realizada com o auxílio de trado. Composteira 28 (3ª coleta: 30/08/2011).**





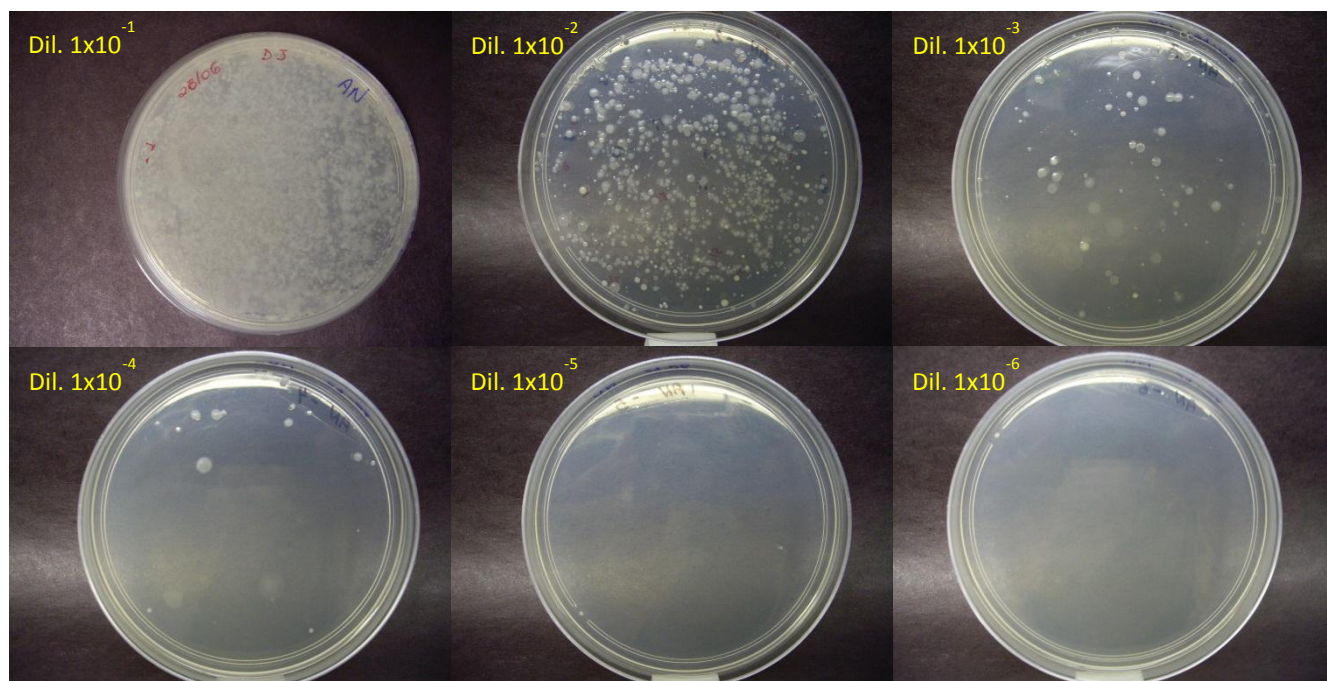
**Figura 4. Perfil da compostagem efetuada.** Os dias de coleta estão indicados por setas na abscissa do gráfico, e as respectivas temperaturas medidas nas coletas indicadas, diretamente no gráfico plotado. A revira está realçada na terceira coleta.

Estudos de ecologia microbiana de compostagem de matéria orgânica baseados em técnicas de cultivo de microrganismos foram relatados para experimentos envolvendo um ponto de análise somente (Strom P.F. 1985a, Strom P.F. 1985b, Nakasaki K. 1994). Este trabalho de mestrado investiga microrganismos cultivados a partir de amostras de etapas distintas ao longo de um processo de compostagem, integrando-se a um projeto maior onde as mesmas amostras utilizadas para o cultivo de isolados microbianos tiveram seu DNA total isolados e submetidos a sequenciamento de alto desempenho para estudos metagenômicos.

## 5.2. Cultivo e isolamento de microrganismos presentes na compostagem

Tomando-se 100 µl de cada diluição seriada realizada a partir de cada amostra de compostagem coletada, estas alíquotas foram espalhadas sobre toda a superfície do meio sólido de cultura apropriado, contido em placa de Petri, com o auxílio de uma alça de Drigalski estéril. Neste estudo, foram utilizados 3 meios de cultura (AN, BHI, R2A), que não apresentam seletividade e favorecem o crescimento da maior parte dos microrganismos quimioheterotróficos, cultiváveis presentes na compostagem.

No total, a cada coleta, foram geradas 18 placas, que foram chamadas de “placas-matrizes” por conterem material da compostagem diretamente plaqueado após diluição. As placas-matrizes foram incubadas em estufa bacteriológica a 30°C, e o crescimento de colônias isoladas foi acompanhado diariamente em todas as diluições. Desta forma, pôde-se obter isolados capazes de formar colônias após 24, 48, 72, 96 ou 120 horas, representando microrganismos com tempos de geração distintos. A partir das placas-matrizes, nas diluições e tempos de incubação pertinentes, foram coletadas colônias isoladas (Figura 5), as quais foram posteriormente semeadas em nova placa com mesmo meio de cultura para a obtenção de culturas puras, que foram, então, estocadas em ultrafreezer após cultivo em meio de cultura líquido (LB) contendo glicerol, como descrito anteriormente.

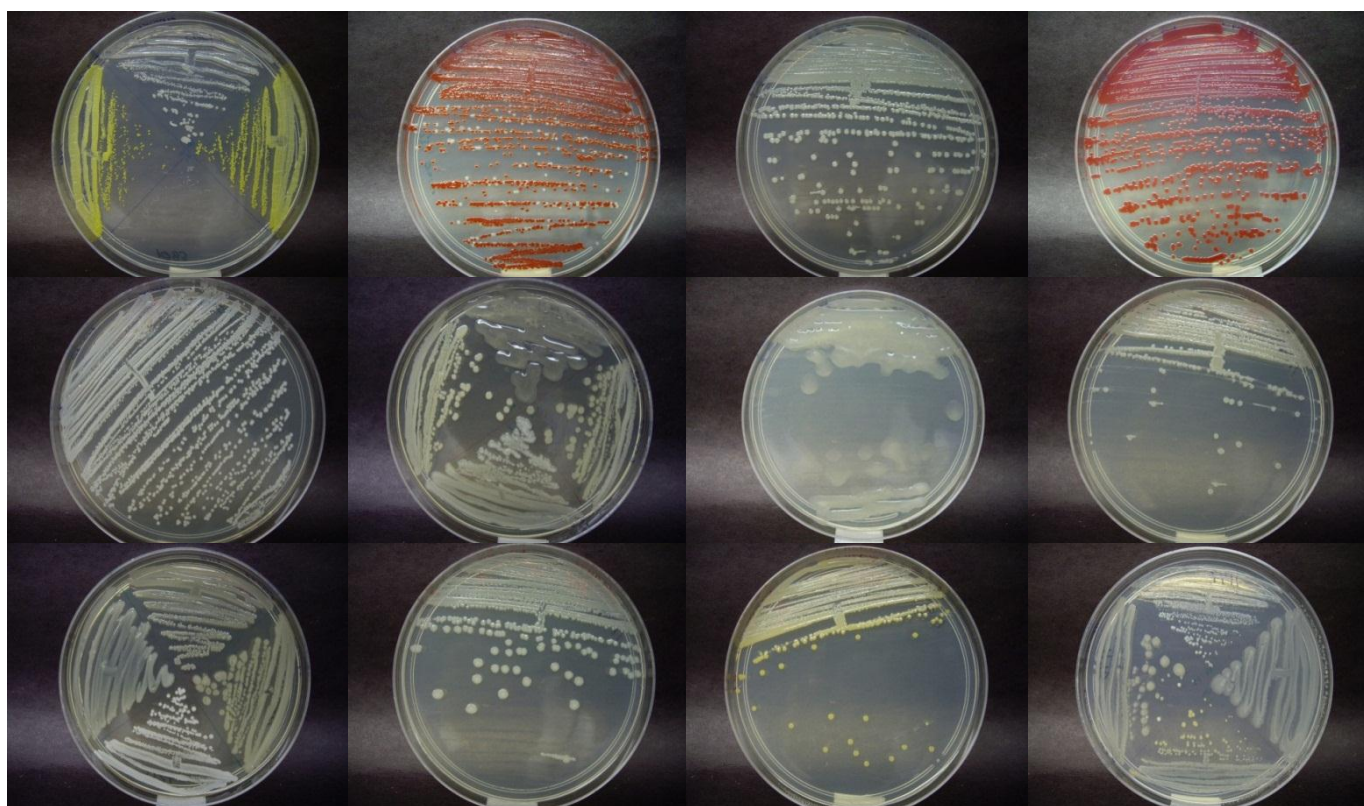


**Figura 5. Registro fotográfico digitalizado.** Placas contendo meio de cultura Ágar Nutriente, onde colônias isoladas de microrganismos provenientes das diluições seriadas foram cultivados por 24 horas a 30 °C, 24 horas após a coleta.

Em geral, placas que foram semeadas a partir da alíquota de diluição  $1 \times 10^{-1}$  inviabilizaram a coleta de colônias isoladas, pois as colônias confluíram ao longo do crescimento e, portanto, não puderam ser utilizadas. Placas contendo diluição de  $1 \times 10^{-2}$ , apesar de também apresentarem colônias em demasia, possibilitaram a obtenção de colônias isoladas em alguns casos. Diluições  $1 \times 10^{-3}$  e  $1 \times 10^{-4}$  foram as mais viáveis para coleta de colônias isoladas em todos os pontos considerados no estudo, sendo a diluição  $1 \times 10^{-4}$  a mais satisfatória para coleta após 24 horas de

cultivo. Placas com diluições  $1 \times 10^{-5}$  e  $1 \times 10^{-6}$  apresentaram um pequeno número de colônias isoladas, mas se mostraram úteis para o isolamento de microrganismos com tempo de crescimento lento.

Além do crescimento em meios de cultura e do tempo de geração, utilizou-se como critério para a obtenção de maior variabilidade microbiana a visualização prévia das colônias, com auxílio de uma lupa de aumento (8 vezes), e assim se pôde coletar colônias que apresentassem macromorfologia diferenciada, como exemplificado na Figura 6. Outras características fenotípicas de colônia, como a formação de véu ou apresentação de muco favorecendo o crescimento invasivo por toda a placa, foram úteis em etapas posteriores do trabalho.



**Figura 6. Amostra de Isolados adquiridos ao longo dos isolamentos.** A diversidade dos isolados pode ser visualizada pela macromorfologia de colônias (cor, formato, textura).



### 5.2.1. Registro de dados do processo de isolamento de microrganismos da C28

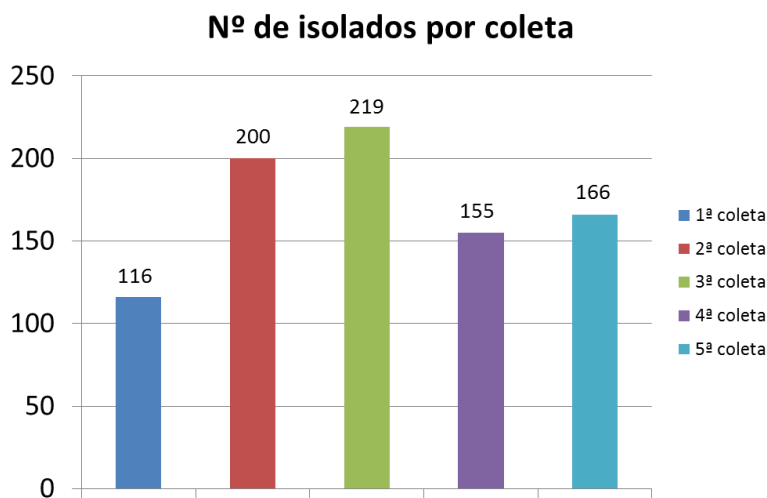
Com o objetivo de gerar um banco de dados cumulativo, todas as placas contendo culturas microbianas foram fotografadas com câmera fotográfica Canon Power Shot SX120 IS, ajustada na qualidade macro, utilizando tripé e uma base de apoio que mantém sempre a mesma distância do objeto fotografado. Todas as imagens foram captadas dentro do fluxo laminar, para assegurar a esterilidade durante e após o registro (Figura 7).



**Figura 7. Registro fotográfico de isolados microbianos.** Dentro de fluxo laminar, para evitar contaminação, foi colocado um aparato concebido e executado no LIMic, capaz de posicionar a câmera fotográfica e as placas a serem registradas.

### 5.2.2. Isolados Adquiridos em momentos do processo de compostagem

Ao todo foram obtidos 856 isolados oriundos de material da compostagem C28, e cinco pontos do processo (Figura 8).



**Figura 8. Número de isolados obtidos em cada ponto de coleta.** O número de isolados em cada coleta está indicado acima de cada coluna.

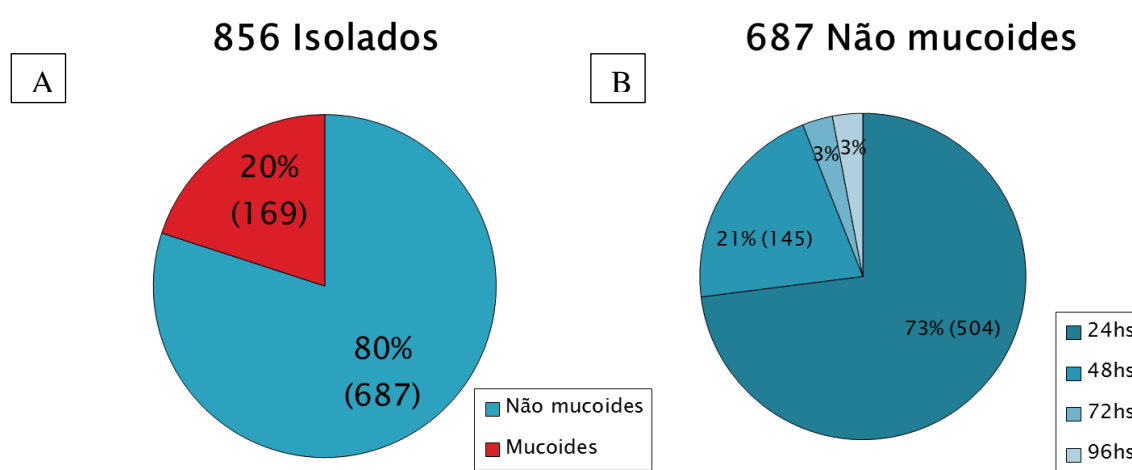
### 5.2.3. Características fenotípicas dos isolados

Quanto à pesquisa sobre isolados com características mucoides, que em geral atrapalham muito a triagem de isolados por tomarem a placa sobrepondo-se a outras colônias, mostrou-se interessante para pesquisa posterior pois a maior parte dos isolados que apresentaram essa característica, expressaram amilase e/ou protease mas, no teste de proporcionalidade de diâmetro do halo de degradação sobre o diâmetro da colônia, mostrou-se ineficiente para esse caso, uma vez que as colônias se espalhavam sobre a placa gerando uma colônia grande e, consecutivamente, um baixo índice, mesmo quando o halo de degradação apresentava um número alto. Porém não podemos afirmar que todos com essa característica são isolados diferentes ou fazem parte de um grupo de isolados clones, coletados diversas vezes, mesmo que a seleção tenha sido feita com o auxílio de lupa e tomados todos os cuidados, como diferenciação de tempo de crescimento, aspecto, coloração, comportamento da colônia sobre a placa e diferenciação macromorfológica para não coletar isolados parecidos entre si.

Também notamos que os isolados, segundo literatura, de pesquisas sobre microrganismos que expressam enzimas termófilas, em sua maioria são bacilos, mostrando nossa pesquisa estar de acordo com a literatura (GORLACH-LIRA, Krystyna; COUTINHO, Henrique D.M., 2007; PASCON et al., 2011),

Dos 856 isolados, 169 apresentaram muco após crescimento por 24 horas em meio de cultura sólido. Os 687 não mucoides foram subdivididos em: 504 que geraram colônias após 24 horas de crescimento; 145, após 48 horas; 20, após 72 horas; e 18, após 96 horas (Figura 9).

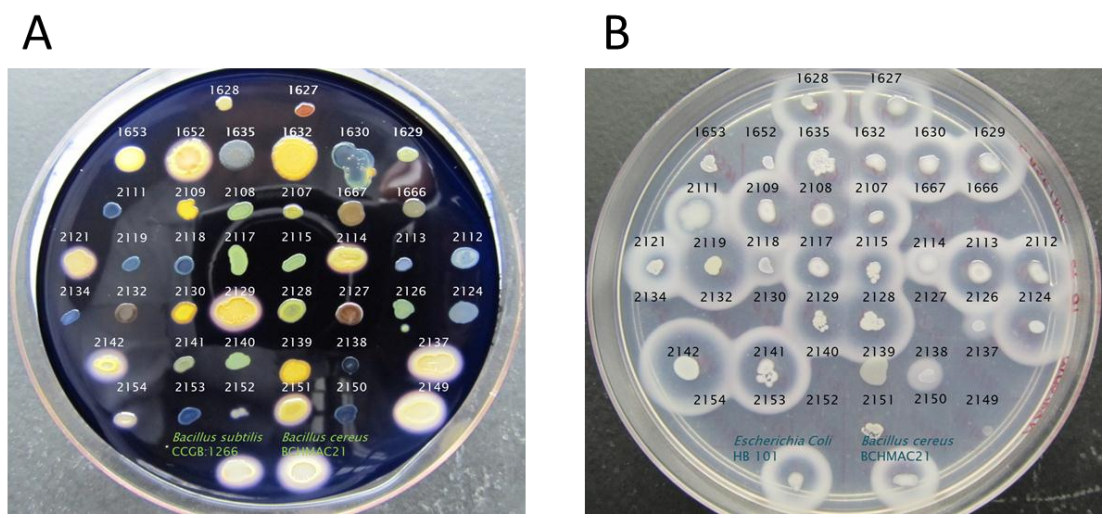
Essas características mucoides de alguns isolados dificultaram o cultivo e isolamento de outros microrganismos presentes na mesma placa por colonizarem de maneira invasiva toda a extensão da placa e contaminar as demais amostras, e por esse motivo foram caracterizadas e estudadas separadamente nos experimentos e mostraram, em sua maioria, capacidade de hidrólise dos substratos amilase e protease.



**Figura 9. Número total de isolados divididos, em mucoides e não mucoides.** (A) Total de isolados obtidos após isolamento. (B) Total de isolados não mucoides, divididos por tempo de crescimento em meio de cultura sólido.

### 5.3. Seleção de microrganismos capazes de secretar amilases e/ou proteases

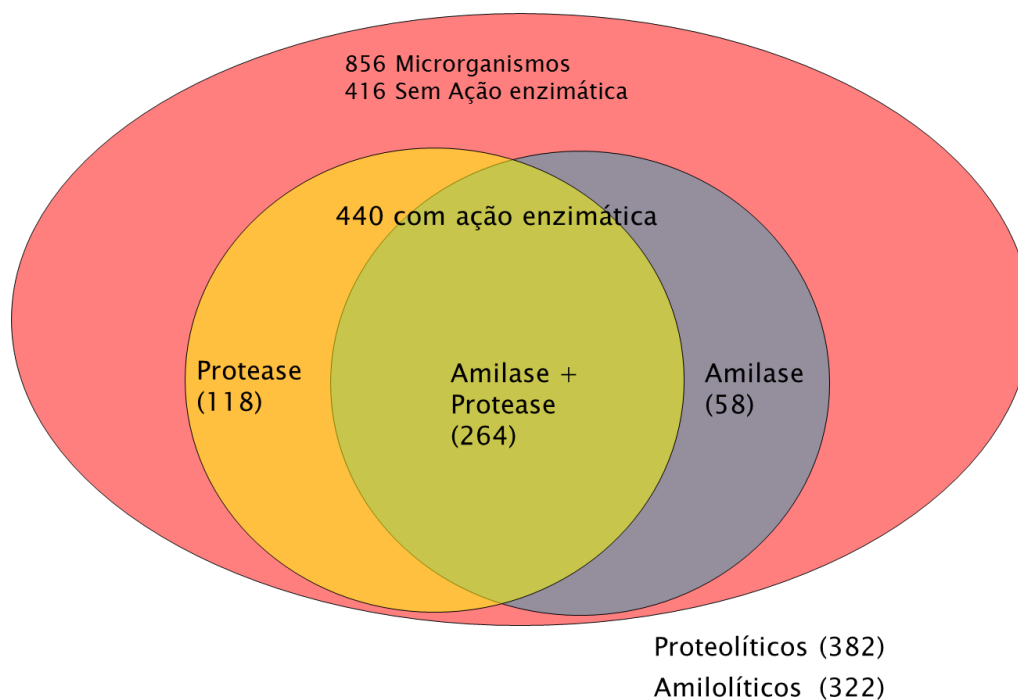
O estudo visando à caracterização de microrganismos capazes de metabolizar amido e proteína presentes em meio de cultura sólido, como principais fontes de carbono, foi realizado com todos os 856 isolados, segundo a metodologia de halo de degradação (Figura 10).



**Figura 10. Triagem para seleção de isolados amilolíticos e proteolíticos.** (A) Isolados em placa de Petri com meio de cultura contendo amido como principal fonte de carbono, para caracterizar amilolíticos por formação de halo. (B) Isolados em placa de Petri com meio de cultura contendo caseína como principal fonte de carbono, para caracterizar proteolíticos por formação de halo.

Desta forma, 382 microrganismos mostraram-se proteolíticos 322 amilolíticos e 264 microrganismos com capacidade de mostrar halo de degradação para ambos substratos (Figura 11). Estes microrganismos foram selecionados para estudos posteriores, e os 416 microrganismos restantes, que não mostraram degradação desses substratos pela metodologia utilizada, não foram analisados e continuarão estocados no banco de microrganismos.

## ATIVIDADE ENZIMÁTICA GERAL



**Figura 11. Diagrama com os microrganismos isolados e submetidos à análise de produção de amilases e proteases extracelulares.** Em rosa, são englobados todos os microrganismos isolados neste estudo; em laranja, estão os microrganismos proteolíticos, em violeta, os amilolíticos; e em verde, os amilolíticos e proteolíticos.

. Os 440 microrganismos capazes de secretar amilases e/ou proteases são de nosso interesse, por apresentarem ação hidrolítica extracelular (caracterizada pelo método de halo em placa), e portanto selecionados para análises subsequentes em busca dos melhores secretores de amilase e protease.



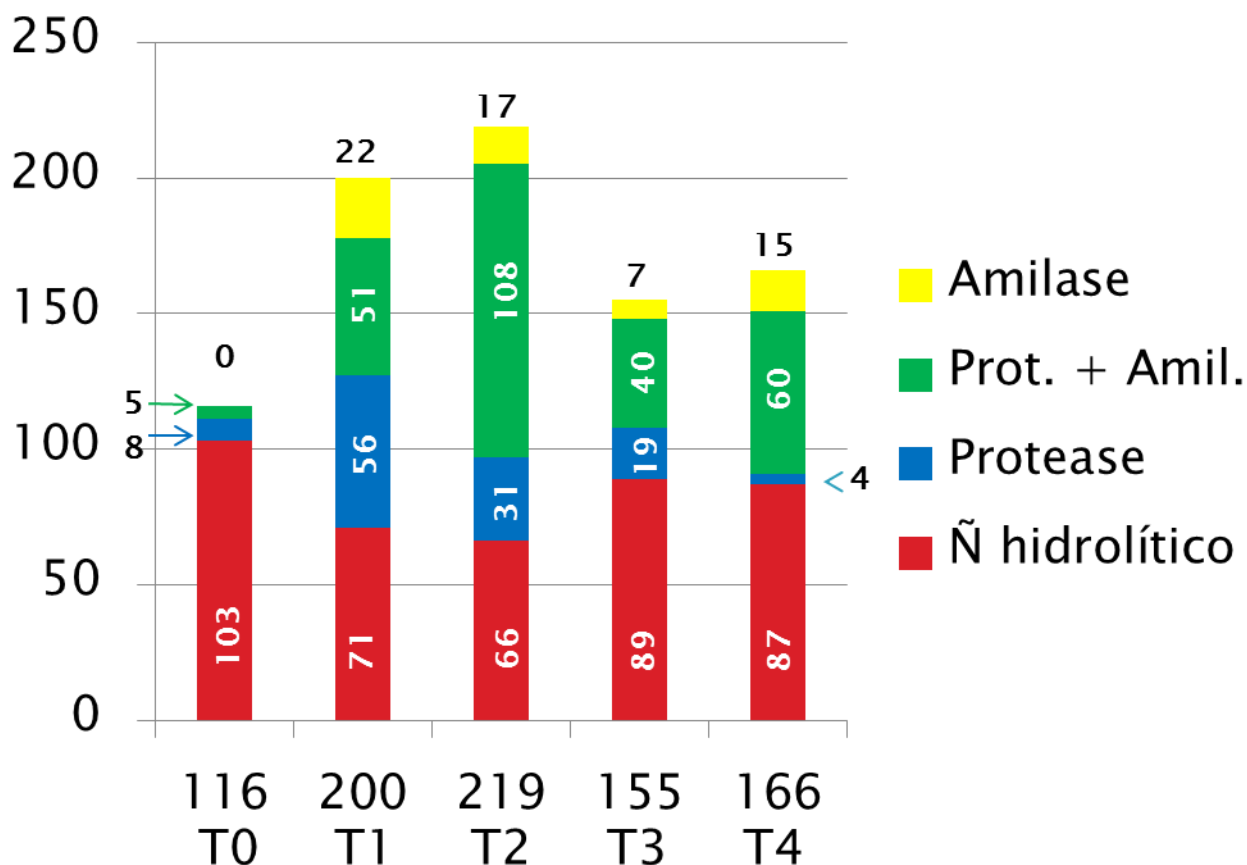
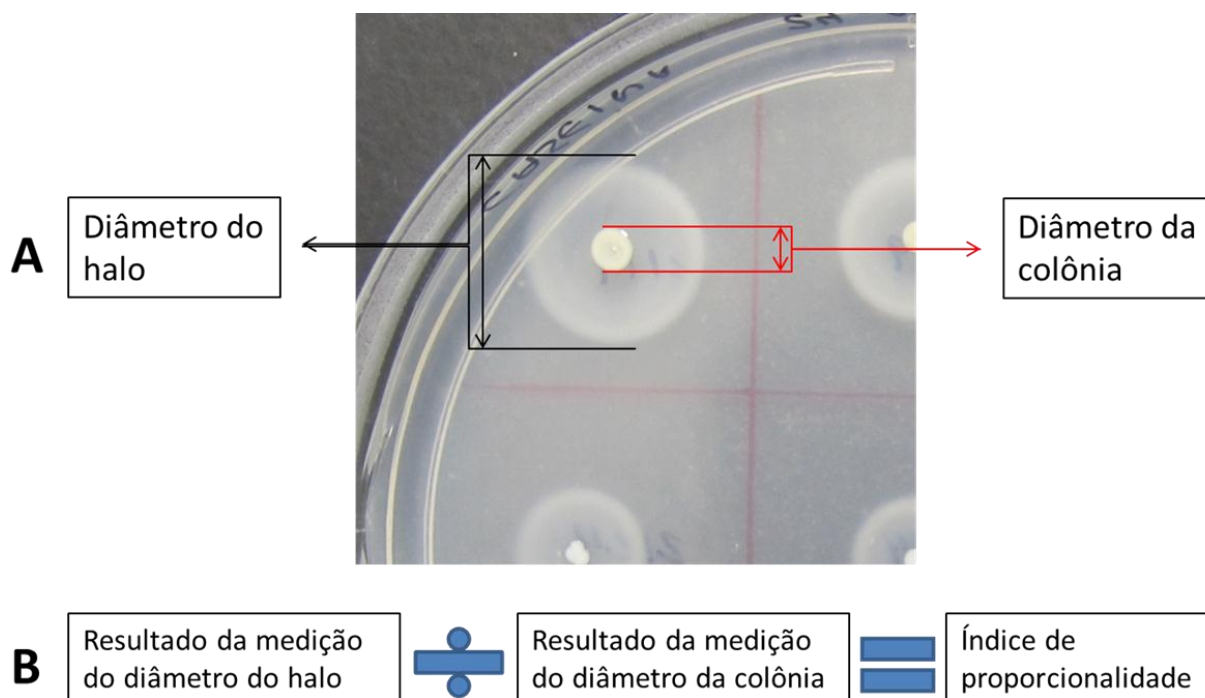


Figura 12. Perfil hidrolítico dos microrganismos

#### 5.4. Seleção de microrganismos formadores de halo de degradação em placa

Uma vez selecionados os 440 microrganismos capazes de formar halo de degradação de amido e/ou proteína em meio de cultura em placa, procedeu-se à quantificação do halo formado para cada isolado, pela medida da proporção do diâmetro do halo em relação ao diâmetro da colônia formada em meio de cultura contendo amido solúvel como principal fonte de carbono, para caracterização dos isolados amilolíticos; e caseína, para caracterização de proteolíticos. As análises foram baseadas em imagens fotográficas registradas a partir dos experimentos de halo de degradação, com o auxílio de um aparato que possibilita os registros sempre a uma mesma distância entre a câmera e as placas contendo os experimentos (Figura 7).

As medidas de diâmetro de halo e colônia para cada isolado (Figura 13A) foram efetuadas com o auxílio de uma régua. O diâmetro do halo de degradação foi dividido pelo diâmetro da colônia, dando origem a um índice de proporcionalidade definido por essas medidas (Figura 13B), e, por consequência, evidenciando os melhores secretores de amilases ou de proteases.



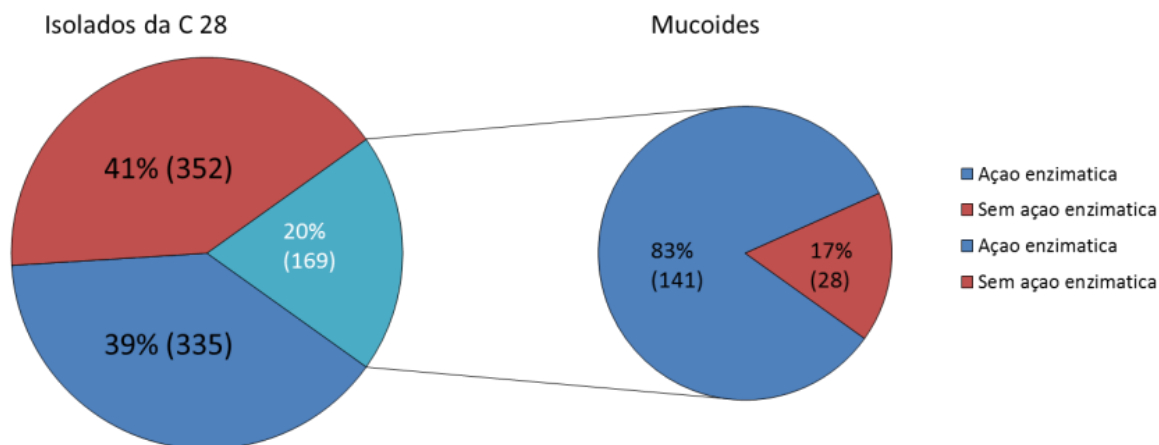
**Figura 13. Medida do Índice de proporcionalidade.** (A) Medição do diâmetro do halo e diâmetro da colônia para obtenção do índice de proporcionalidade. (B) Cálculo utilizado para obtenção do índice de proporcionalidade de diâmetro halo/colônia.

Dentre os índices obtidos para amilolíticos, 56 isolados apresentaram o menor índice (1,1), sendo que o melhor índice foi de 5,1, para o isolado UCM 1572. Para os proteolíticos, a maior parte apresentou índice 1,1, e o índice mais alto foi 7,5, para o isolado UCM 1232.

### 5.5. Seleção dos melhores produtores de amilase e protease

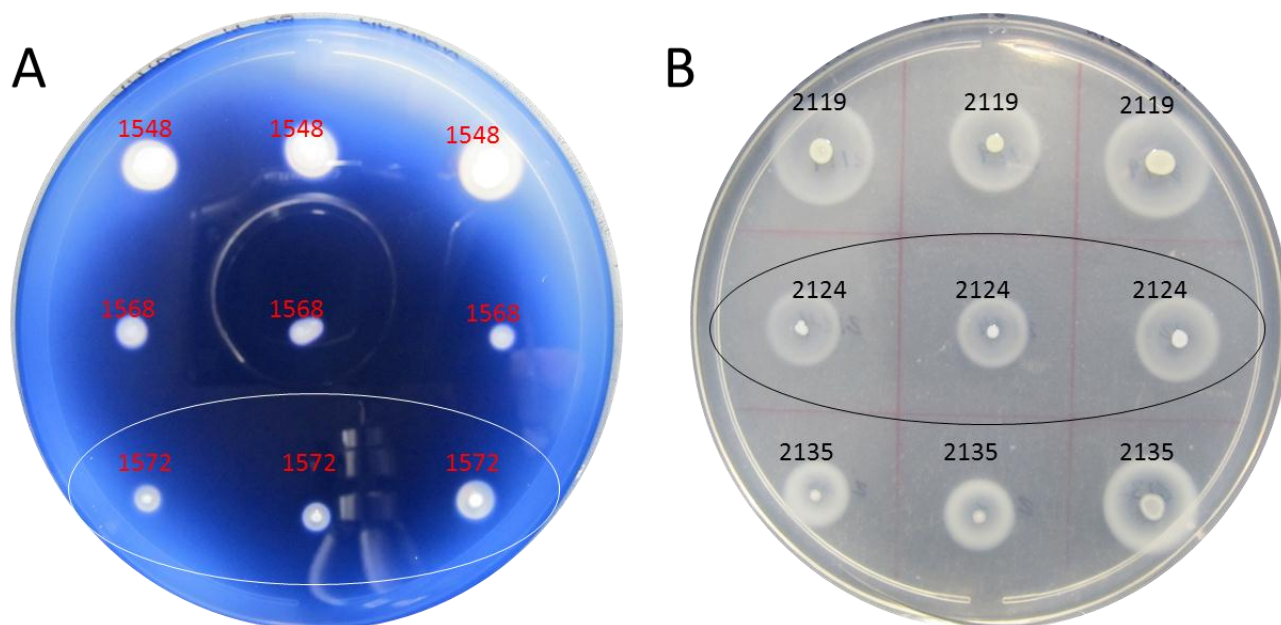
Fez-se nova seleção entre os produtores de amilase e protease considerando os melhores índices dentre os 440 isolados proteolíticos ou amilolíticos e, assim, elegemos os que apresentaram índice de proporcionalidade igual ou superior a 1,8 para amilolíticos, e a 3,0 para proteolíticos. Para essa nova seleção, levou-se em consideração também outros aspectos relevantes, como a data da coleta, para se trabalhar com isolados obtidos nas cinco coletas da C28, abrangendo todo o processo de compostagem. A característica fenotípica de visualização de muco ou véu também foi considerada, pois, como mostrado na Figura 14, as colônias que apresentavam essa característica mostraram-se percentualmente mais secretores de amilases e/ou proteases do que as que não apresentavam essa característica.

## Perfil hidrolítico dos isolados da C28



**Figura 14. Perfil hidrolítico dos isolados da compostagem 28 (C28).** Em azul claro (esquerda), são representados isolados mucoides (formadores de muco ou véu). O diagrama a direita representa os isolados mucoides divididos entre secretores de amilase e/ou protease e aqueles não secretores ou cuja secreção não foi detectada no ensaio de formação de halo de degradação.

Utilizando esses critérios para a seleção dos isolados de maior interesse, obteve-se um montante de 44 isolados (Figura 15), sendo 21 com índice de degradação de amido em placa de Petri considerado na seleção, e 25 para bons produtores de protease em placa de Petri. Dentre esses, o isolado UCM 1568 apresentou índice superior ao de corte tanto para o teste com amido (2,2) quanto para o teste com caseína (5,1). Os 44 microrganismos selecionados apresentaram diferenciação quanto a características fenotípicas, possibilitando prosseguir na classificação destes.



**Figura 15. Teste quantitativo de formação de halo em placa, realizado em triplicata.** (A) Experimento que quantifica amilase por formação de halo em 21 amostras. (B) Experimento que quantifica protease por formação de halo em 26 amostras.

Com os resultados apresentados em triplicata, calculou-se a média e o desvio-padrão, como demonstrado na Figura 16. Neste experimento, dois microrganismos tiveram o maior índice: um em placa com meio de cultura contendo amido como principal fonte de carbono (UCM 1572  $5,1 \pm 1,5$ ) e um em placa com meio de cultura contendo caseína como principal fonte de carbono (UCM 1232  $7,5 \pm 1,2$ ).

Codigo	Indice Amilase	D.P	Indice Protease	D.P	Data da coleta
UCM 922	2,3	± 0,3			1º Coleta
UCM 1040			5,5	± 0,9	2º Coleta
UCM 1078	2,8	± 0,5			2º Coleta
UCM 1082	2,3	± 0,3			2º Coleta
UCM 1084	1,3	± 0,1			2º Coleta
UCM 1104	2,1	± 0,2			2º Coleta
UCM 1110			4,8	± 0,6	2º Coleta
UCM 1165			4,8	± 0,8	2º Coleta
UCM 1167			5,0	± 0,5	2º Coleta
UCM 1232			7,5	± 1,2	2º Coleta
UCM 1234			4,6	± 0,0	2º Coleta
UCM 1482	2,3	± 0,3			3º Coleta
UCM 1489	1,8	± 0,2			3º Coleta
UCM 1494	2,1	± 0,2			3º Coleta
UCM 1497	2,1	± 0,4			3º Coleta
UCM 1501	2,1	± 0,1			3º Coleta
UCM 1514			6,0	± 0,5	3º Coleta
UCM 1515	2,2	± 0,3			3º Coleta
UCM 1548	2,3	± 0,1			3º Coleta
UCM 1568	2,8	± 1	5,1	± 0,1	3º Coleta
UCM 1572	5,1	± 1,5			3º Coleta
UCM 1577			5,7	± 0,7	3º Coleta
UCM 1580			5,5	± 0,6	3º Coleta
UCM 1586			5,7	± 0,9	3º Coleta
UCM 1587			6,3	± 0,3	3º Coleta
UCM 1597	3,1	± 0,4			3º Coleta
UCM 1599			5,5	± 0,6	3º Coleta
UCM 1603			5,0	± 0,3	3º Coleta
UCM 1609	2,2	± 0,5			3º Coleta
UCM 1612			5,4	± 0,2	3º Coleta
UCM 1619	2,5	± 0,2			3º Coleta
UCM 1694			5,7	± 0,3	3º Coleta
UCM 2107			5,0	± 0,6	4º Coleta
UCM 2119			5,3	± 0,5	4º Coleta
UCM 2124			6,0	± 0,2	4º Coleta
UCM 2135			5,2	± 0,5	4º Coleta
UCM 2141	2,2	± 0,1			4º Coleta
UCM 2146			5,6	± 0,2	4º Coleta
UCM 2155			5,5	± 0,5	4º Coleta
UCM 2169			5,6	± 0,3	4º Coleta
UCM 2282	3	± 0,3			4º Coleta
UCM 2685			4,9	± 0,4	5º Coleta
UCM 2704			6,0	± 0,5	5º Coleta
UCM 2754	3,1	± 0,5			5º Coleta

**Figura 16. Índice gerado em experimento realizado em triplicata e cálculo da média e do desvio-padrão.** Colunas brancas: número das amostras e data da coleta; colunas azuis: dados obtidos de experimento com amido; colunas beges: dados obtidos de experimento com caseína.

## 5.6. Caracterização de isolados por coloração de Gram

Com o objetivo de prosseguirmos na caracterização dos 44 isolados selecionados, realizou-se teste de coloração por método de Gram, o que forneceu a diferenciação morfológica entre esses microrganismos e acrescentou mais um dado importante ao banco de dados (Figura 17) nos mostrando quantos possíveis clones podem representar isolados fenotipicamente idêntico e quantos isolados únicos podem ser estimados (Figura 17), baseado em dados do resultado de Gram, tempo de crescimento e ação hidrolítica para amido e/ou caseína. Desta forma, podemos estimar 17 classes de microrganismos, sendo 11 como isolados únicos e 6 como grupos de possíveis clones. Destes 5 e 4 correspondem a isolados únicos e 3 grupos de clones, para amilolíticos e proteolíticos, respectivamente.

		Código	Índice triplicata Amilase	D.P	Tempo de Crescimento	Gram	Proteolítico	Coleta
Isolado único	←	UCM 1597	3,1 ± 0,4		24hs	Bacilo (-)	NÃO	3ª
Fenotípicos idênticos	{	UCM 1082	2,3 ± 0,3		48hs	Bacilo (-)	NÃO	2ª
		UCM 1084	2,3 ± 0,3		48hs	Bacilo (-)	NÃO	2ª
		UCM 1572	5,1 ± 1,5		24hs	Bacilo (+)	NÃO	3ª
Isolado único	←	UCM 2282	3 ± 0,3		48hs	Cocos (-)	NÃO	4ª
Isolado único	←	UCM 2754	3,1 ± 0,5		24hs	Cocos (+)	NÃO	5ª
Fenotípicos idênticos	{	UCM 922	2,3 ± 0,3		24hs	Bacilo (-)	SIM	1ª
		UCM 1078	2,8 ± 0,5		24hs	Bacilo (-)	SIM	2ª
		UCM 1501	2,1 ± 0,1		24hs	Bacilo (-)	SIM	3ª
		UCM 1619	2,5 ± 0,2		24hs	Bacilo (-)	SIM	3ª
		UCM 1548	2,3 ± 0,1		24hs	Bacilo (-)	SIM	3ª
Fenotípicos idênticos	{	UCM 1482	2,3 ± 0,3		24hs	Bacilo (+)	SIM	3ª
		UCM 1489	1,8 ± 0,2		24hs	Bacilo (+)	SIM	3ª
		UCM 1494	2,1 ± 0,2		24hs	Bacilo (+)	SIM	3ª
		UCM 1497	2,1 ± 0,4		24hs	Bacilo (+)	SIM	3ª
		UCM 1515	2,2 ± 0,3		24hs	Bacilo (+)	SIM	3ª
		UCM 1568	2,8 ± 0,7		24hs	Bacilo (+)	SIM	3ª
		UCM 1609	2,2 ± 0,5		24hs	Bacilo (+)	SIM	3ª
Isolado único	←	UCM 2141	2,2 ± 0,1		24hs	Bacilo (+)	SIM	4ª
		UCM 1104	2,1 ± 0,2		24hs	Cocos (+)	SIM	2ª

A

B

	Código	Índice triplicata Protease	D.P	Tempo de Crescimento	Gram	Amilolítico	Coleta
Isolado único	UCM 1232	7,5 ± 1,2		96hs	Bacilo (+)	NÃO	2ª
Isolado único	UCM 2169	5,6 ± 0,3		24hs	Cocos (-)	NÃO	4ª
Fenotípicos idênticos	UCM 1165	4,8 ± 0,8		24hs	Cocos (+)	NÃO	2ª
	UCM 1167	5,0 ± 0,5		24hs	Cocos (+)	NÃO	2ª
	UCM 1577	5,7 ± 0,7		24hs	Cocos (+)	NÃO	3ª
	UCM 1580	5,5 ± 0,6		24hs	Cocos (+)	NÃO	3ª
	UCM 1586	5,7 ± 0,9		24hs	Cocos (+)	NÃO	3ª
	UCM 1587	6,3 ± 0,3		24hs	Cocos (+)	NÃO	3ª
	UCM 1599	5,5 ± 0,6		24hs	Cocos (+)	NÃO	3ª
	UCM 2119	5,3 ± 0,5		24hs	Cocos (+)	NÃO	4ª
	UCM 2124	6,0 ± 0,2		24hs	Cocos (+)	NÃO	4ª
	UCM 2155	5,5 ± 0,5		24hs	Cocos (+)	NÃO	4ª
Isolado único	UCM 1694	5,7 ± 0,3		72hs	Cocos (+)	NÃO	3ª
Isolado único	UCM 1040	5,5 ± 0,9		24hs	Bacilo (-)	NÃO	2ª
Isolado único	UCM 2704	6,0 ± 0,5		24hs	Bacilo (+)	NÃO	5ª
Fenotípicos idênticos	UCM 2135	5,2 ± 0,5		24hs	Bacilo (-)	SIM	4ª
	UCM 2146	5,6 ± 0,2		24hs	Bacilo (-)	SIM	4ª
	UCM 2685	4,9 ± 0,4		24hs	Bacilo (-)	SIM	5ª
Fenotípicos idênticos	UCM 1110	4,8 ± 0,6		24hs	Bacilo (+)	SIM	2ª
	UCM 1514	6,0 ± 0,5		24hs	Bacilo (+)	SIM	3ª
	UCM 1568	5,1 ± 0,1		24hs	Bacilo (+)	SIM	3ª
	UCM 1603	5,0 ± 0,3		24hs	Bacilo (+)	SIM	3ª
	UCM 1612	5,4 ± 0,2		24hs	Bacilo (+)	SIM	3ª
Isolado único	UCM 2107	5,0 ± 0,6		24hs	Bacilo (+)	SIM	4ª
	UCM 1234	4,6 ± 0,0		96hs	Bacilo (+)	SIM	2ª

**Figura 17. Características dos 44 isolados selecionados como melhores amilolíticos e/ou proteolíticos.** As chaves representam os possíveis clones tanto para a figura A, que contém os isolados selecionados para amilolíticos, quanto para a figura B, que representa os isolados proteolíticos. As caixas em vermelho dentro das planilhas salientam os isolados agrupados como possíveis clones.

Baseados em resultados de teste de coloração de Gram, tempo de crescimento e perfil proteolítico e amilolítico, caracterizamos seis grupos como possíveis clones e nove isolados como únicos (Figura 16). Dentre os isolados amilolíticos (Figura 16A) duas amostras amilolíticas possivelmente clonais foram isolados a partir da segunda coleta. Quatro bacilos Gram (-) formam um grupo de supostos clones com ação do início do processo de compostagem até antes da revira, na primeira, segunda e terceira coleta, fase na qual a temperatura é elevada favorecendo o crescimento de microrganismos extremófilos e apresenta abundância de substratos com cadeia carbônica pequena e de fácil degradação. Oito isolados clonais Gram (+) foram obtidos a partir da terceira coleta, com oito isolados da coleta 3 e um da coleta 4 portanto 14 dias após a revira, num período onde as temperaturas da compostagem variaram entre 53,2°C e 74,3°C, fase onde os

microrganismos residentes necessitam degradar substratos mais complexos como a lignina para extrair carbono e nitrogênio para sobrevivência e reprodução. Os isolados amilolíticos únicos distribuíram-se entre um da coleta 2, dois da coleta 3, um da coleta 4 e um da coleta 5, representando, portanto, etapas diversas do processo de compostagem. Na Figura 16B quatro proteolíticos únicos foram obtidos das coletas 2 (dois isolados), 3 e 4. Um primeiro grupo contendo dez isolados possivelmente clonais, Cocos Gram (+), crescimento em 24hs, foram isolados da coleta 2 (dois isolados), coleta 3 (cinco isolados) e coleta 4 (três isolados). Um grupo com três possíveis clones pertencentes as coletas 4 e 5, bacilos Gram (-), período em que a revira traz aeração ao sistema, com temperaturas mais baixas. Isso pode nos sugerir que esses microrganismos são mesófilos, mas que degradam substratos complexos como a lignina. Nesta última fase, são produzidas substâncias húmicas para transformar o “composto” maduro. Finalmente, um grupo com seis possíveis clones cocos Gram (+) foram isolados a partir das coletas 2 (um isolado), 3 (quatro isolados) e 4 (um isolado) sugerindo que degradam substratos complexos e simples mas que estando ausentes na primeira e quinta coleta, têm preferência por elevada temperatura para sobrevivência e colonização do substrato orgânico com metabolização deste para manutenção e reprodução da colônia.

### **5.7. Identificação de isolados por espectrometria de massa**

Quanto à identificação por espectrometria de massa, não prevemos que os isolados obtidos em sua maioria não estariam inseridos no banco da Bruker, mas é aceitável que isso ocorra, pois esse banco é composto por amostras clínicas e nossos isolados são de origem ambiental. Porém a espectrometria de massa nos foi muito útil para seleção de possíveis fenotípicos similares em nossos isolados.

Iniciamos a identificação dos 440 microrganismos amilolíticos e proteolíticos por espectrometria de massa (MALDI TOF-MS), na qual de 72 análises identificamos 1 amostra com *score* 2.367, que identifica gênero e espécie, 10 amostras caracterizadas por gênero *score* entre 2.000 e 2.299, caracterizadas por possível gênero com *score* entre 1.700 e 1.999; obtivemos 61 amostras com *score* abaixo de 1.700, em que é caracterizado como não identificado, como demonstrado na figura 18.



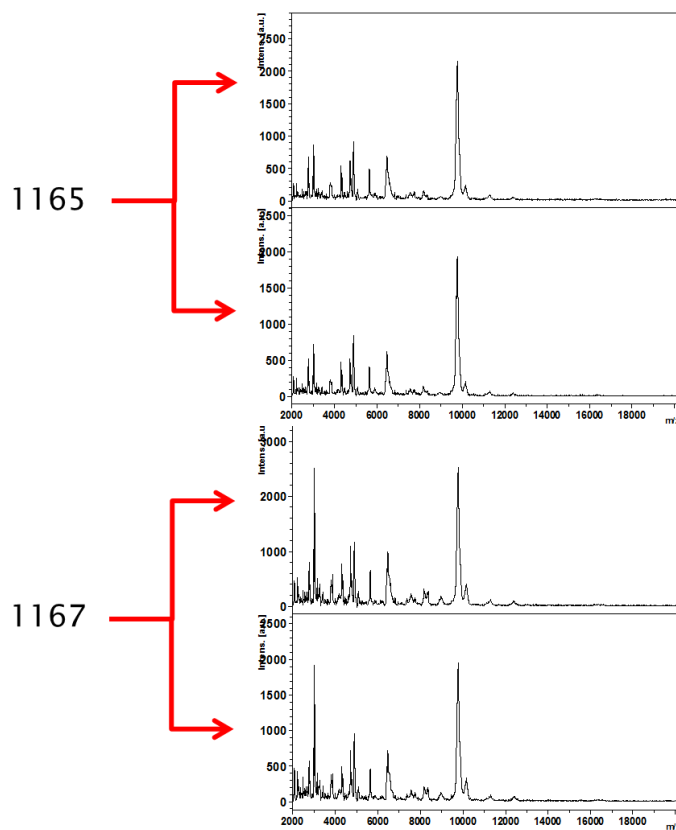
Codigo	Analise por Biotyper	Score	Simbolos
UCM 0922	Não identificado	1635	(-)
UCM 1040	SERRATIA RUBIDAEA	2283	(++)
UCM 1042	SERRATIA RUBIDAEA	2186	(++)
UCM 1044	Não identificado	1526	(-)
UCM 1046	Não identificado	1586	(-)
UCM 1047	BACILLUS CEREUS	2367	(+++)
UCM 1050	BACILLUS MEGATERIUM	1859	(+)
UCM 1053	SERRATIA RUBIDAEA	1965	(+)
UCM 1058	Não identificado	1664	(-)
UCM 1060	Não identificado	1563	(-)
UCM 1063	UED 861	1857	(+)
UCM 1064	UED 861	1715	(+)
UCM 1067	Não identificado	1454	(-)
UCM 1071	Não identificado	1637	(-)
UCM 1072	SERRATIA RUBIDAEA	2021	(++)
UCM 1073	SERRATIA RUBIDAEA	2242	(++)
UCM 1078	UED_857	2299	(++)
UCM 1082	Não identificado	1544	(-)
UCM 1084	Não identificado	1597	(-)
UCM 1100	Não identificado	1537	(-)
UCM 1102	Não identificado	1352	(-)
UCM 1103	SERRATIA RUBIDAEA	2226	(++)
UCM 1104	Não identificado	1598	(-)
UCM 1110	Não identificado	1618	(-)
UCM 1163	Staphylococcus Succinus	2118	(++)
UCM 1164	Não identificado	1543	(-)
UCM 1165	Não identificado	1651	(-)
UCM 1167	STAPHYLOCOCCUS SCIURI	2077	(++)
UCM 1168	Não identificado	1620	(-)
UCM 1170	UED_857	1958	(+)
UCM 1171	Não identificado	1557	(-)
UCM 1175	Não identificado	1389	(-)
UCM 1176	Não identificado	1609	(-)
UCM 1179	BACILLUS PSEUDOFIRMUS	2033	(++)
UCM 1180	STAPHYLOCOCCUS SCIURI	1818	(+)
UCM 1181	STAPHYLOCOCCUS LENTUS	2059	(++)

Codigo	Analise por Biotyper	Score	Simbolos
UCM 1232	Não identificado	1671	(-)
UCM 1234	UED_2378	1787	(+)
UCM 1482	Não identificado	1526	(-)
UCM 1489	Não identificado	1548	(-)
UCM 1494	Não identificado	1435	(-)
UCM 1497	Não identificado	1593	(-)
UCM 1501	Não identificado	1588	(-)
UCM 1503	Não identificado	1521	(-)
UCM 1514	Não identificado	1420	(-)
UCM 1515	Não identificado	1622	(-)
UCM 1548	Não identificado	1535	(-)
UCM 1568	Não identificado	1628	(-)
UCM 1572	Não identificado	1699	(-)
UCM 1577	Não identificado	1548	(-)
UCM 1580	Não identificado	1567	(-)
UCM 1586	Não identificado	1572	(-)
UCM 1587	Não identificado	1672	(-)
UCM 1597	Não identificado	1628	(-)
UCM 1599	Não identificado	1615	(-)
UCM 1603	Não identificado	1627	(-)
UCM 1609	Não identificado	1626	(-)
UCM 1612	Não identificado	1647	(-)
UCM 1619	Não identificado	1682	(-)
UCM 1694	Não identificado	1487	(-)
UCM 2107	Não identificado	1592	(-)
UCM 2119	Não identificado	1495	(-)
UCM 2124	Não identificado	1500	(-)
UCM 2135	UED_2378	1733	(+)
UCM 2141	UED_2378	1723	(+)
UCM 2146	UED_2378	1849	(+)
UCM 2155	Não identificado	1450	(-)
UCM 2169	Não identificado	1451	(-)
UCM 2282	Não identificado	1565	(-)
UCM 2685	Não identificado	1448	(-)
UCM 2704	Não identificado	1594	(-)
UCM 2754	Não identificado	1560	(-)

**Figura 18. 72 isolados analisados por espectrometria de massa em banco de dados biotyper.** Os símbolos representam o grau de identificação comparando com o banco da biotyper. (+++) representa identificação de gênero e espécie, (++) identificação de gênero, (+) possível gênero e (-) não identificado.

A identificação das 440 amostras iniciou-se com a padronização do método de extração seguindo procedimento demonstrado no item Matérias e métodos, e adotamos três controles positivos para a análise das amostras: *Serratia marcescens*, *Escherichia coli* e *Bacillus cereus*.

Nosso objetivo é formarmos um banco local de espectros e compararmos os espectros obtidos na identificação por espectrometria de massa por similaridade entre as amostras analisadas, como demonstrado no exemplo na figura 18, identificando assim possíveis clones e gerando uma estimativa da variedade microbiológica encontrada na pesquisa, pois, embora o banco da Bruker Daltonics tenha um grande número de espectros que caracterizam diversas espécies, esses foram obtidos de microrganismos em análise de casos clínicos e nossos isolados são de origem ambiental.



**Figura 19. Espectros gerados no processo de identificação por espectrometria de massa MALDI TOF-MS em duplicidade.** Os espectros sinalizados como 1165 pertencem a uma amostra e os sinalizados como 1167 pertencem à outra amostra distinta.

Os espectros mostrados na figura 18 parecem similares quando comparado as duas amostras, mas para termos um resultado seguro desta similaridade é necessário a utilização de um programa que faz essa comparação e gera um número que determina quanto elas são similares, caracterizando por gênero e espécie. Utilizamos para essa análise o programa da Biotyper ou o Bionumerics também é possível essa análise na nova versão 7.0 do programa.

## 5.8. Crescimento dos microrganismos

Entre os isolados amilolíticos selecionados como melhores produtores de amilase, realizamos um experimento em nove isolados eleitos como melhores e não fenotipicamente similares, Para tal, foi repicado estes microrganismos em 26 horas de incubação a 39°C sob agitação constante, sendo que observamos que, para essas amostras, o tempo necessário para o crescimento a 39°C é de 16hs, de um modo geral. Após esse período não ocorre aumento significativo de células, por estarem em fase estacionaria, como demonstra a figura 20.

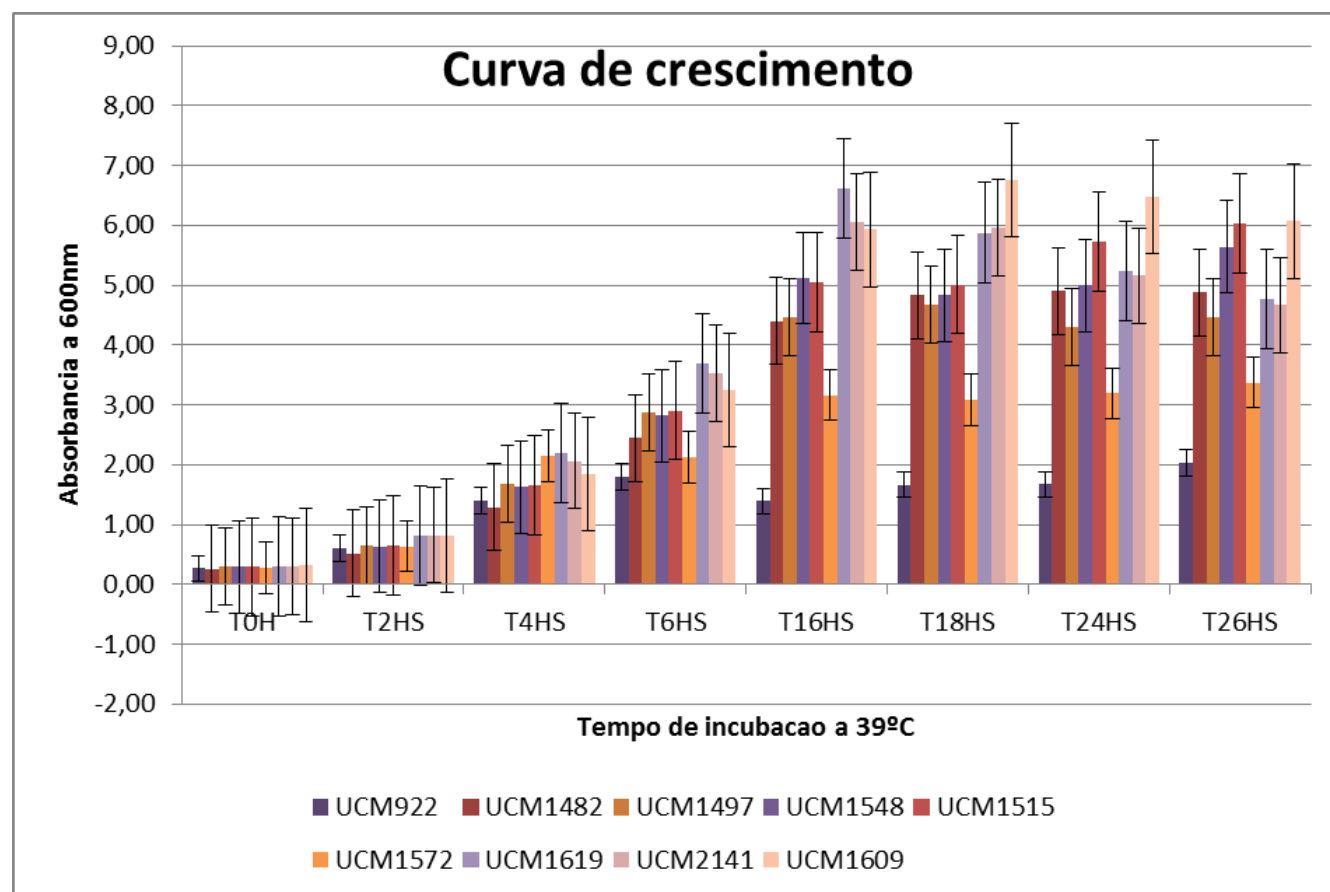
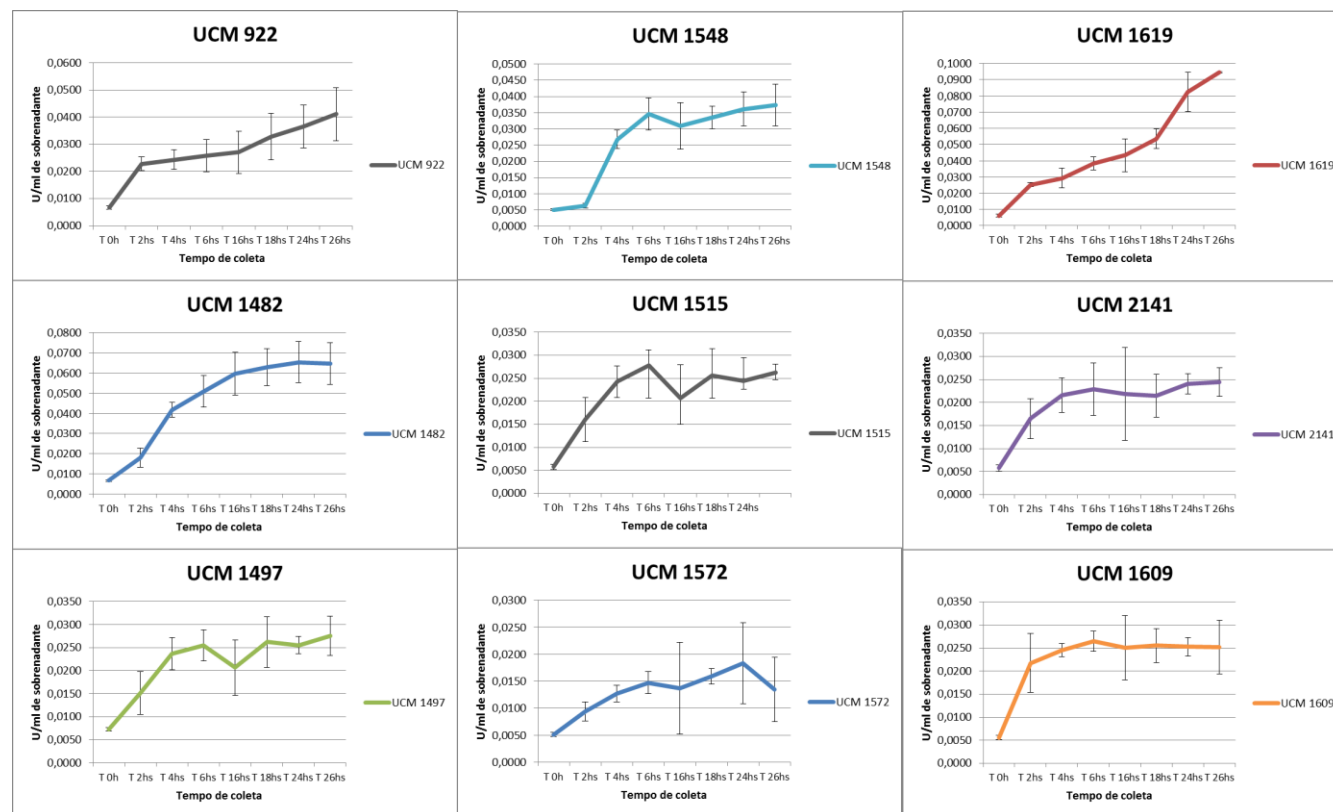


Figura 20. Curva de crescimento para os 9 isolados realizado em nonoplicata.

## 5.9. Medida da atividade de amilase

A ação enzimática foi caracterizada pelo método de DNS, o que possibilitou quantificarmos o açúcar redutor proveniente da quebra do amido presente no sobrenadante das coletas realizadas nos tempos 0h, 2hs, 4hs, 6hs, 16hs, 18hs, 24hs e 26hs do experimento (curva de crescimento demonstrada no item anterior).

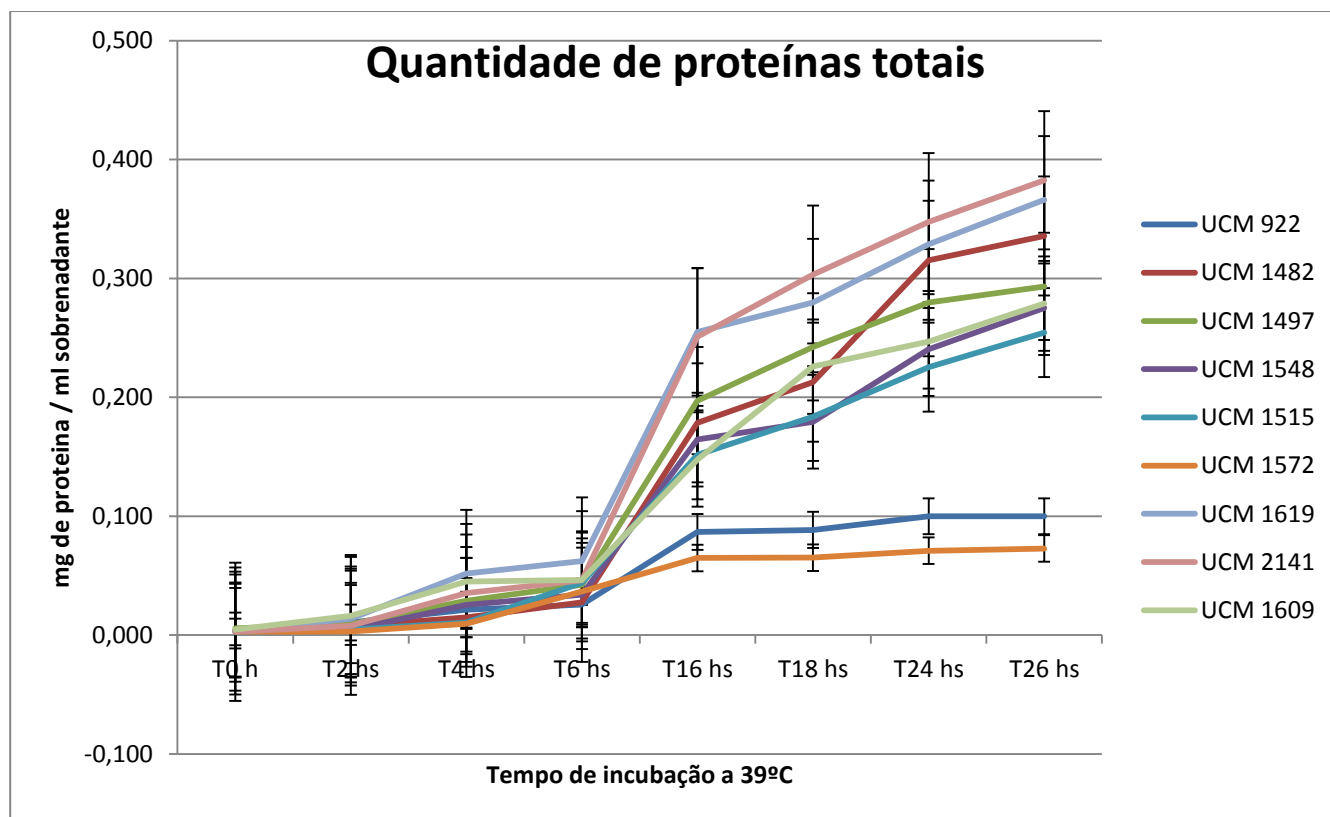


**Figura 21. Quantificação de açúcar redutor pelo método DNS, que determina quanto de amido foi hidrolizado.**

Com isso, caracterizamos a ação enzimática para cada amostra e para demonstrar quanto de amido foi quebrado e transformado em uma molécula menor, designada como açúcar redutor, e também eleger as amostras que apresentaram melhor ação enzimática dentre os 9, que são: UCM922, UCM1548, UCM1619, UCM1482 e UCM1609 por apresentarem uma grande quantidade de açúcar redutor em pouco tempo, como demonstrado na figura 21.

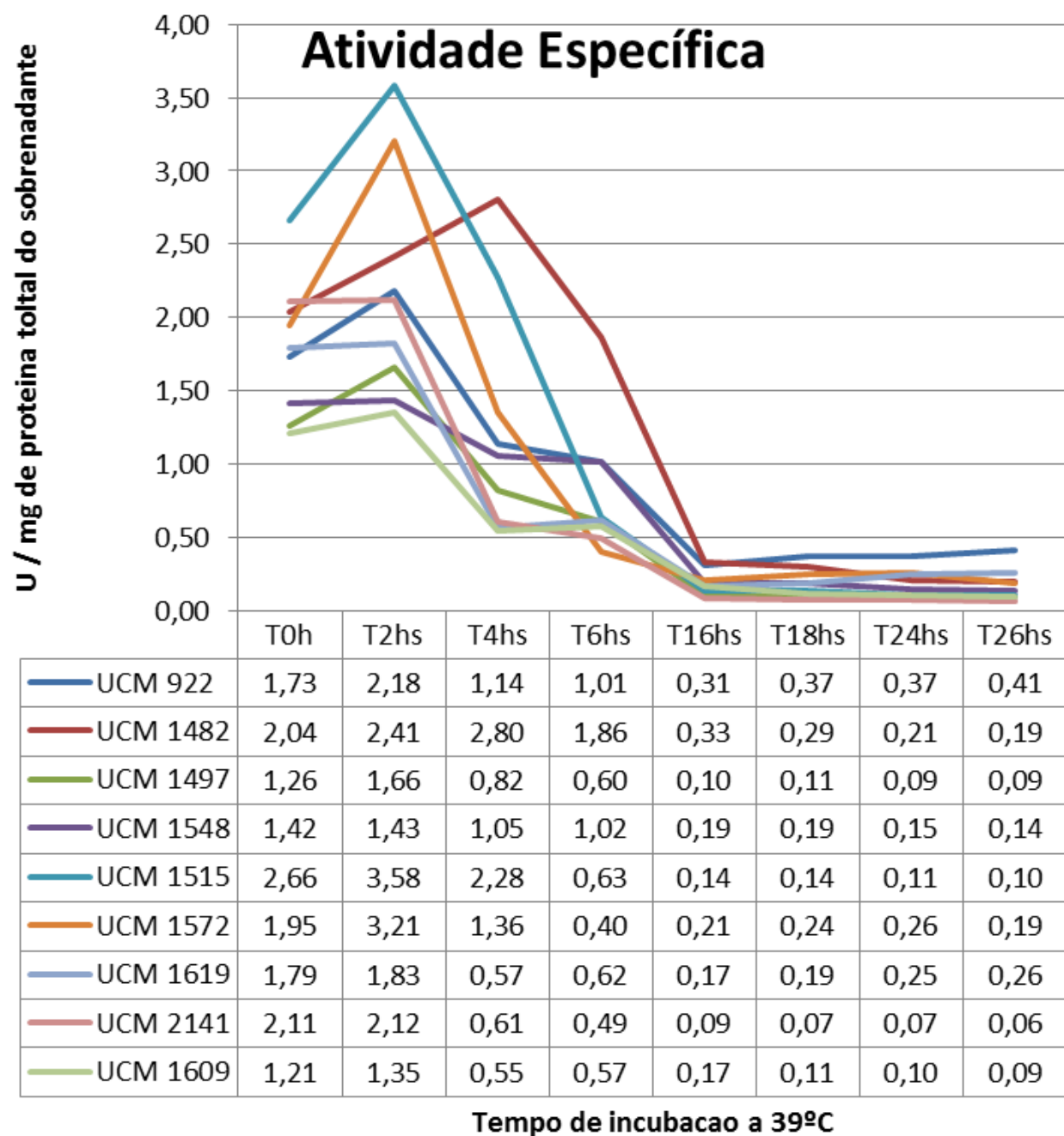
Ainda para os nove isolados, realizamos o experimento para caracterizar a quantidade de proteína presente no sobrenadante das coletas realizadas nos tempos 0h, 2hs, 4hs, 6hs, 16hs, 18hs, 24hs e 26hs do experimento curva de crescimento, pelo método de Bradford, como demonstrado na figura 22, e com isso, não podemos concluir os melhores produtores de enzima, pois o sobrenadante pode conter uma infinidade de outras proteínas que não nossa enzima de

interesse. Também pode conter mais de uma enzima, mas podemos concluir quanto de proteína total temos no sobrenadante das amostras e que a enzima amilase está presente nesse montante.



**Figura 22. Quantidade de proteínas totais presente, determinada pelo método de Bradford.**

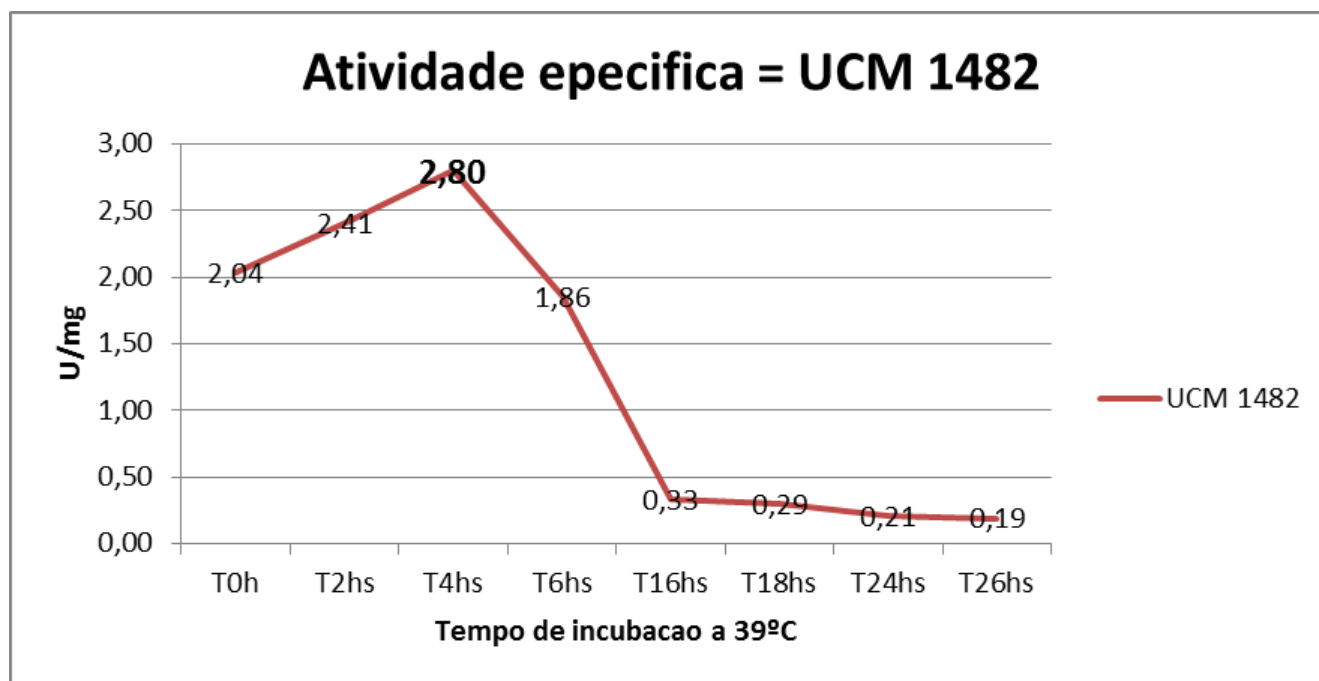
As amostras UCM922 e UCM 1572 apresentaram uma estabilidade na produção de enzima em 16hs, e as demais – UCM1482, UCM1497, UCM1548, UCM1515, UCM1619, UCM2141 e UCM1609 – apresentaram aumento na produção de proteína ao longo do tempo de incubação a 39°C, e as que mais secretaram proteína foram as UCM2141, UCM1619, UCM1497 e UCM1482 (Figura 22). Tal experimento foi importante em nosso trabalho para calcularmos a atividade específica, determinando o tempo ideal em que uma menor quantidade de proteína apresenta a maior quebra do amido em açúcar redutor, e 3 amostras (figura 23), UCM1515, UCM1572 e UCM1482, tiveram destaque nesse aspecto.



**Figura 23. Atividade específica.** Quantidade de proteína ÷ quantidade de açúcar, em que se demonstra quanto de proteína foi necessário para gerar uma quantidade de açúcar, demonstrando qual o tempo necessário para uma melhor eficiência para cada isolado.

As amostras UCM1515, UCM1572, apesar de possuírem uma maior atividade específica, não apresentaram boa produção de açúcar redutor com a quebra do amido, diferente da UCM1482, que apresentou uma boa atividade específica de 4hs de incubação a 39°C, e produziu nesse

período quantidade superior a 0.4 U de (açúcar redutor/ml). Também apresentou uma grande produção de açúcar redutor ao longo do tempo, atingindo a produção máxima em 24hs de incubação, caracterizando o tempo de saturação da quebra do amido para esse analíto.



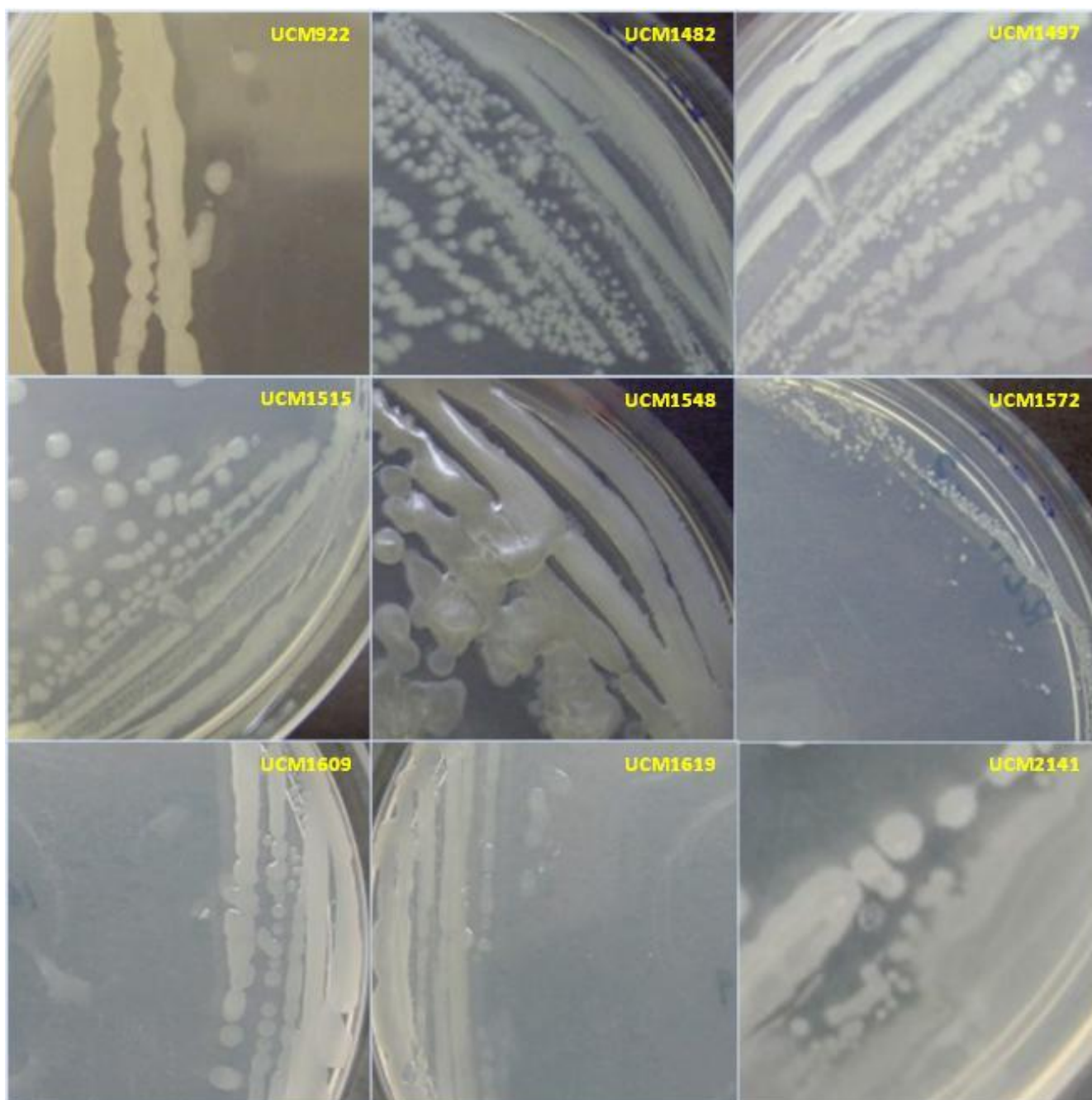
**Figura 24. Atividade do isolado que apresentou a melhor atividade específica**

### **5.10. Macro morfologia dos 9 isolados selecionados**

Quando selecionamos os nove isolados eleitos como os melhores produtores de amilase e iniciamos o experimento de curva de crescimento, concluímos que no geral o melhor tempo para reprodução destas amostras foi de 16hs, incubado a 39°C, e nos testes de DNS que quantifica a hidrólise do amido caracterizando a produção de açúcar redutor, em pouco tempo já atingiram a saturação mesmo que no teste de Bradford, que caracteriza a quantidade de proteína presente, tenha se mantido em geral crescente até o final da curva de crescimento, mostrando que de duas a seis horas de incubação já é determinada a atividade específica para os nove isolados, como demonstrado no item Atividade específica.

Os isolados puderam ser diferenciados a nível macro morfológico, como demonstrados na (figura 25), onde os nove isolados foram crescidos em meio de cultura LB e aspectos como tamanho das colônias, presença ou ausência de muco, coloração e brilho estão evidentes, assim como uma similaridade entre as amostras UCM1482 com UCM1497 e UCM1609 e UCM1619.





**Figura 25. Macromorfologia dos nove isolados amilolíticos selecionados**



### 5.11. Testes bioquímicos

Quando realizamos os testes enzimáticos para amilase e protease, pudemos notar que mesmo isolados obtidos em coletas que possuíam a temperatura mais elevada, eles estavam presentes no processo, o que favorece a pesquisa de uma enzima robusta termoestável.

Como já era esperado, não foram identificados os microrganismos com a utilização do kit Painel para enterobactérias PROBAC DO BRASIL®, mas conseguimos com esse teste caracterizar atividades enzimáticas e produção de produtos metabólicos dos 9 isolados selecionados, como o indol – caracteriza a capacidade do microrganismo degradar o aminoácido essencial triptofano presente em quase todas as proteínas e o produto dessa degradação é o indol, utilizado como marcador (MOHITE, B 2013). Nenhuma de nossas amostras degradarem o triptofano em indol.

Voges Proscauer, que caracteriza a via metabólica de degradação da glicose de acordo com o produto final desta quebra, podendo ser ácido láctico (LIMA, Cristiane Pereira de et al., 2012), ácido acético (FERREIRA, D.J. et al., 2011) e ácido fórmico (LEAO, Jean Pacheco et al., 2012), tais produtos, podem ou não serem desejados na indústria ou na agricultura. Encontramos em UCM0922, UCM1497, UCM1515, UCM1548, UCM1572, UCM1609 e UCM2141 essas características. Esses compostos finais também podem ser composto neutro, como o acetil metil carbinol que pode ser utilizado como marcador de enteropatogenicidade (BRAVO FARINAS, LAURA et al., 1995). Essa diferença de pH pode ser reconhecida com a adição de hidróxido de potássio e alfa naftol, com indicador para evidenciar a presença de produtos finais neutros que foram identificados em UCM1482 e UCM1619 dentre as nove.

Utilizamos o método de Citrato de Simmons para verificar a utilização do citrato como única fonte de carbono pelo microrganismo, UCM0922, UCM1482. UCM1497, UCM1515, UCM1548, UCM1609, UCM1619 e UCM2141 dentre os nove isolados utilizaram o citrato como única fonte de carbono para se multiplicar, composto muito utilizado pela indústria farmacêutica na formulação de fármacos e pesquisa (ROQUE, Fátima et al., 2013; BEVILACQUA, José Luís et al., 2011).

Um método para detecção de liberação de enxofre utiliza enxofre inorgânico sulfeto de hidrogênio, alguns métodos de decomposição e liberação de nutrientes são carentes quanto à liberação do enxofre (TEIXEIRA, C.M. et al., 2009) e este é um composto muito utilizado na indústria química e na agricultura (OLIVEIRA, P.P.A. et al., 2005), hoje é extraído do calcário na forma gasosa de óxido de enxofre (SOUZA, F. de; BRAGANCA, S. R., 2013). Porém nem sempre a

quebra do enxofre é bem-vinda em um microrganismo, pois existem muitos compostos de enxofre que possuem uma toxicidade elevada, além de um odor desagradável que, dependendo da utilização, não é desejável (NETO, L.; MENDES-FERREIRA, A. A., 2005) e nenhuma de nossas amostras apresentou liberação de enxofre utilizando enxofre inorgânico.

Um teste para constatar hidrólise da ureia, confirmando a presença ou não de urease expressa pelo microrganismo, que na indústria, buscam ambas as características, como no cultivo de arroz ou de cana de açúcar, em que a urease não é bem-vinda, e buscam um inibidor da urease (MARCHESAN, E. et al., 2013) ou uma forma eficiente e barata de incorporar ao solo, como no plantio de cana de açúcar (CANTARELLA, Heitor et al., 2008), nenhuma amostra apresentou hidrólise da ureia, por outro lado, como a ureia é produto de excreção renal atóxico do corpo humano, gerada pelo ciclo da ureia, é muito utilizada como fonte de nitrogênio para o cultivo de microrganismo por ser uma fonte relativamente barata (D'AGOSTINI, E.C. et al 2011; CARVALHO, G.G.P. de et al., 2010).

A *Triptofano desaminase* é utilizado para diagnóstico da desaminação oxidativa do *L-triptofano* pela *L-triptofano desaminase*, que resulta na formação de cetoácido que, em presença de ferro, apresenta uma coloração esverdeada no meio, o triptofano é utilizado em dieta de animais e no enriquecimento de rações quando esse está ausente na composição (CAMPOS, A.M.de A. et al., 2012). Esse é um método de identificação de bacilos gram negativos e de urease positivos, o que confirma o resultado do teste de urease, pois os 9 isolados analisados são bacilos e 3 dentre os nove isolados; UCM0922, UCM1548 e UCM1619, são Gram negativos, porém nenhum apresentou urease positiva no teste bioquímico.

Estudos de descarboxilação de arginina, ornitina e lisina são muito utilizados para caracterização de enterobactérias, como é a proposta desse painel utilizado e em diversos estudos envolvendo alimentos ou ambientes hospitalares (LEYVA, V. et al., 2008), porém não estamos estudando propriamente enterobactérias, uma vez que a composteira do FPZSP possui uma diversidade muito grande de microrganismos, provenientes de vários ambientes distintos; apenas o isolado UCM1548 expressou descarboxilação para a lisina, UCM0922, UCM1482. UCM1497, UCM1515, UCM1548, UCM1572 e UCM1619 para a arginina e UCM0922, UCM1482. UCM1497, UCM1515, UCM1609, UCM1619 e UCM2141 ornitina.

Fazendo um crescimento microbiano utilizando como única fonte de carbono o malonato desidratado, que possui uma estabilidade quando desidratado a uma temperatura elevada (LOCATELLI, J. R. et al. 2010), obtemos uma fonte que poderia ser utilizada em estudos

posteriores, uma vez que visamos microrganismos termófilos e enzimas resistentes e funcionais em altas temperaturas, para utilização na indústria, mas não apresentaram crescimento utilizando o malonato como única fonte de carbono. Outras informações que esses testes nos deram foram a fermentação ou não de diversos açúcares como; lactose, sacarose, manitol, adonitol, mioinositol, sorbitol, rafinose, ramnose, maltose, melobiose e galactose – mas estudos confirmam que na busca por  $\alpha$ -amilase, que é nossa enzima de interesse, podem ser prejudiciais na produção de amilase com a adição de açúcares ao meio (TEODORO, C. E. de S.; MARTINS, M. L. L., 2000) e nossas amostras apresentaram UCM1482, UCM1515, UCM1548, UCM1609 como fermentadoras da sacarose, UCM1572 fermentadora de ramnose, UCM1482, UCM1515, UCM1548, UCM1572, UCM1609, UCM1619 e UCM2141 fermentadora de maltose e UCM1572 fermentadora de melobiose. A grande maioria apresentou fermentação de açúcares, além de confirmação de oxidação da glicose que oito; UCM0922, UCM1482, UCM1497, UCM1515, UCM1548, UCM1572, UCM1609 e UCM2141 dentre as nove oxidam a glicose. A degradação desses açúcares por microrganismos é muito estudada nos tempos de hoje com interesse na produção de bioetanol, e novas fontes para a produção do mesmo também (TSUKAMOTO, J.; DURAN, N.; TASIC, 2013; SOUZA, O. et al., 2012) e na produção de bebidas alcoólicas (CANCELIER, A. et al., 2013; ALCARDE, A. R.; SOUZA, P. A. de; BELLUCO, A. E. de S., 2010).

O teste de ONPG é utilizado na diferenciação dos membros de *enterobacteriaceae* e baseia-se na atividade de  $\beta$ -D-Galactosidade, enzima que determina a capacidade do microrganismo fermentar lactose e, apesar de não termos fermentação positiva da lactose para nenhum dos isolados, a amostra UCM 1497 expressou atividade neste teste, e no teste que caracteriza a capacidade do microrganismo hidrolisar a esculina, todas apresentaram tal capacidade.

Além do painel de enterobactérias PROBAC®, também fizemos um teste de oxidase positiva ou negativa, importante para a identificação de bactérias gram negativas, caracterizando quais microrganismos apresentam um sistema de transporte de elétrons denominado sistema citocromo oxidase (TEBALDI, V.M.R. et al., 2008; CABRERA R., Luis E. et al 2007), porém as nove amostras apresentaram oxidase negativa.

	IND	V.P.	C. S.	H2S	URE	PDA	LIS	ARG	ORN	MLN	GLIC	LAC	SAC	MAN	ADO	MIO	SOR	RAF	RAM	MAL	MEL	ONPG	ESC	OXD
UCM1482	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
UCM1497	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)
UCM1515	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
UCM1548	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
UCM1572	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)
UCM1609	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
UCM1619	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
UCM2141	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
UCM922	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)

LISTA DE ABREVIÇÕES					
IND	Indol	ORN	Descarboxilação de ornitina	SOR	Fermentação de sorbitol
V.P.	Voges Proskauer	MLN	Malonato	RAF	Fermentação de rafinose
C.S.	Citrato de Simmons	GLIC	Fermentação de glicose	RAM	Fermentação de ramnose
H2S	Produção de H2S	LAC	Fermentação de lactose	MAL	Fermentação de maltose
URE	Hidrólise da uréia	SAC	Fermentação de sacarose	MEL	Fermentação de melobiose
PDA	Triptofano desaminase	MAN	Fermentação de manitol	ONPG	$\beta$ -D-galactosidase
LIS	Descarboxilação de lisina	ADO	Fermentação de adonitol	ESC	Hidrólise da esculina
ARG	Descarboxilação de arginina	MIO	Fermentação de mioinositol	OXD	Oxidase

**Figura 26. Perfil metabólico dos nove isolados**

## 5.12. Sequenciamento de amplicons do 16S rDNA de 9 isolados bacterianos

Os nove isolados bacterianos selecionados para análise das amilases secretadas em meio de cultura geram espectros de massa de boa qualidade porém não foram identificados pois não constam no banco de dados da Bruker, composto predominantemente de isolados clínicos. Portanto, com o intuito de prosseguir na identificação taxonômica destes isolados foram amplificados por PCR os fragmentos do rDNA 16S e sequenciados. O amplicon de 464pb foi amplificado com *primers* que, comprovados experimentalmente, se revelaram o melhor par para a amplificação da maioria de táxons bacterianos para estudos de diversidade microbiana por sequenciamento de nova geração de rDNA 16S de amostras ambientais de água superficial do mar do norte na costa da ilha alemã de Helgoland (Klindworth A. et al. 2012). A análise das sequência por blastn mostraram que os nove isolados estudados correspondem a bactérias do gênero *Bacillus*. A identificação de espécie não foi conclusiva pois para todos os isolados identidade de sequência de 99% e 100% mais de uma espécie foram elencadas: UCM922: *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*; UCM1515, UCM1482, UCM1619, UCM1609, UCM1497, UCM1548, UCM2141: *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus tequilensis*; UCM1572: *Paenibacillus xylanexedens*, *Paenibacillus barcinonensis*, *Paenibacillus pabuli*, demonstrados na figura

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

12 -CAGGATGCGCTTGGGACGAGTGTCTCTCT-ATTTCTAGCATTTCAAGGTAAC
19 -CAGGATGCGCTTGGGACGAGTGTCTCTCT-AGGCTTACGATTTCAAGGTAAC
16 -CAGGATGCGCTTGGGACGAGTGTCTCTCTACATCTTACGATTTCAAGGTAAC
17 -CAGGATGCGCTTGGGACGAGTGTCTCTCTACATCTTACGATTTCAAGGTAAC
11 -CAGGATGCGCTTGGGACGAGTGTCTCTCTACATCTTACGATTTCAAGGTAAC
15 -CAGGATGCGCTTGGGACGAGTGTCTCTCT-ATTTCTAGCATTTCAAGGTAAC
13 -CAGGATGCGCTTGGGACGAGTGTCTCTCT-ATTTCTAGCATTTCAAGGTAAC
14 CTTACGGGGGACGAGTGTGTCTTCTGCAATGGACGAAATCTGAGGAGGAGG
18 CTTACGGGGGACGAGTGTGTCTTCTGCAATGGACGAAATCTGAGGAGGAGG
* * * * *

12 GTGGAATTCACCTCTCTCTCTGCACTCAAGTTCCAGTTTCAGTGA-CCTTCGC
19 GTGGAATTCACCTCTCTCTCTGCACTCAAGTTCCAGTTTCAGTGA-CCTTCGC
16 GTGGAATTCACCTCTCTCTCTGCACTCAAGTTCCAGTTTCAGTGA-CCTTCGC
17 GTGGAATTCACCTCTCTCTCTGCACTCAAGTTCCAGTTTCAGTGA-CCTTCGC
11 GTGGAATTCACCTCTCTCTCTGCACTCAAGTTCCAGTTTCAGTGA-CCTTCGC
15 GTGGAATTCACCTCTCTCTCTGCACTCAAGTTCCAGTTTCAGTGA-CCTTCGC
13 GTGGAATTCACCTCTCTCTCTGCACTCAAGTTTCAGTTTCAGTGA-CCTTCGC
14 CAGTGTCTGATGATGAGGTTTCTGATCTGAAAGTCTCTGTTAGGGAACACAGTAC
18 CAGTGTCTGATGAGGTTTCTGATCTGAAAGTCTCTGTTAGGGAACACAGTAC
* * * * *

12 GTTGAAGCGGGGCTTTCACATCAG-ACCTTAA-AAAAGCGCTGAGGCGCTTACGCG
19 GTTGAAGCGGGGCTTTCACATCAG-ACCTTAA-AAAAGCGCTGAGGCGCTTACGCG
16 GTTGAAGCGGGGCTTTCACATCAG-ACCTTAA-AAAAGCGCTGAGGCGCTTACGCG
17 GTTGAAGCGGGGCTTTCACATCAG-ACCTTAA-AAAAGCGCTGAGGCGCTTACGCG
11 GTTGAAGCGGGGCTTTCACATCAG-ACCTTAA-AAAAGCGCTGAGGCGCTTACGCG
15 GTTGAAGCGGGGCTTTCACATCAG-ACCTTAA-AAAAGCGCTGAGGCGCTTACGCG
13 GTTGAAGCGGGGCTTTCACATCAG-ACCTTAA-AAAAGCGCTGAGGCGCTTACGCG
14 GTTGAAGCGGGGCTTTCACATCAG-ACCTTAA-AAAAGCGCTGAGGCGCTTACGCG
18 GTTGAAGCGGGGCTTTCACATCAG-ACCTTAA-AAAAGCGCTGAGGCGCTTACGCG
* * * * *

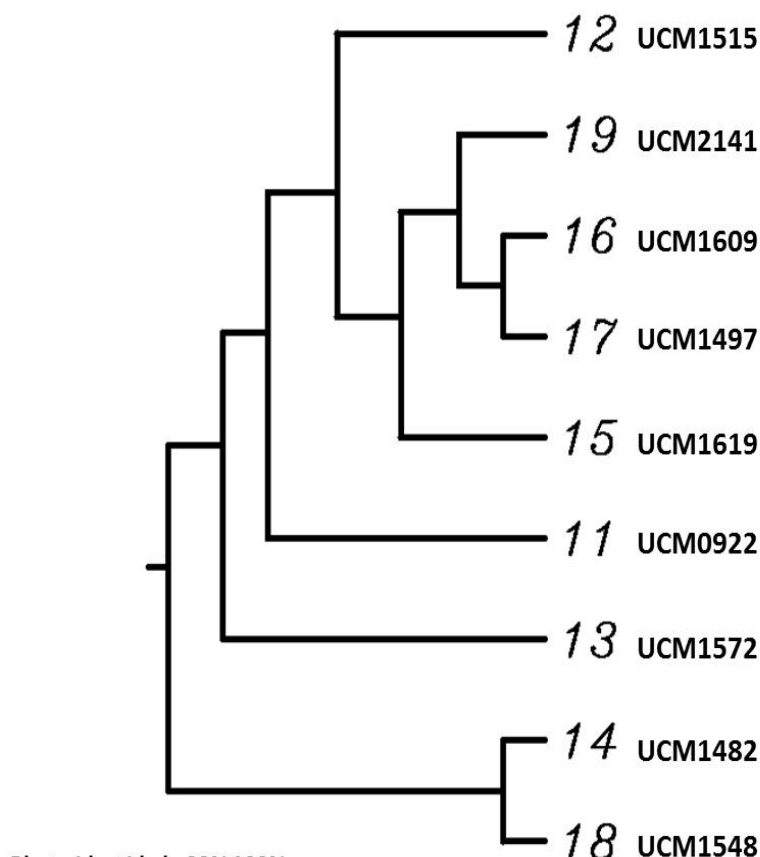
12 CAATATTCGACGACGCTTGCACCTAGCTATTCAGCGGCTGCTGGCAGTATAG
19 CAATATTCGACGACGCTTGCACCTAGCTATTCAGCGGCTGCTGGCAGTATAG
16 CAATATTCGACGACGCTTGCACCTAGCTATTCAGCGGCTGCTGGCAGTATAG
17 CAATATTCGACGACGCTTGCACCTAGCTATTCAGCGGCTGCTGGCAGTATAG
11 CAATATTCGACGACGCTTGCACCTAGCTATTCAGCGGCTGCTGGCAGTATAG
15 CAATATTCGACGACGCTTGCACCTAGCTATTCAGCGGCTGCTGGCAGTATAG
13 CAATATTCGACGACGCTTGCACCTAGCTATTCAGCGGCTGCTGGCAGTATAG
14 CAATATTCGACGACGCTTGCACCTAGCTATTCAGCGGCTGCTGGCAGTATAG
18 CAATATTCGACGACGCTTGCACCTAGCTATTCAGCGGCTGCTGGCAGTATAG
* * * * *

12 C-CGTGGCTTTCTGTTAGGTACGCTCAAGGTAACGCTATTGAAAGCTACTTGTCT
19 C-CGTGGCTTTCTGTTAGGTACGCTCAAGGTAACGCTATTGAAAGCTACTTGTCT
16 C-CGTGGCTTTCTGTTAGGTACGCTCAAGGTAACGCTATTGAAAGCTACTTGTCT
17 C-CGTGGCTTTCTGTTAGGTACGCTCAAGGTAACGCTATTGAAAGCTACTTGTCT
11 C-CGTGGCTTTCTGTTAGGTACGCTCAAGGTAACGCTATTGAAAGCTACTTGTCT
15 C-CGTGGCTTTCTGTTAGGTACGCTCAAGGTAACGCTATTGAAAGCTACTTGTCT
13 C-CGTGGCTTTCTGTTAGGTACGCTCAAGGTAACGCTATTGAAAGCTACTTGTCT
14 C-CGTGGCTTTCTGTTAGGTACGCTCAAGGTAACGCTATTGAAAGCTACTTGTCT
18 C-CGTGGCTTTCTGTTAGGTACGCTCAAGGTAACGCTATTGAAAGCTACTTGTCT
* * * * *

12 TCCCT--AAACACAGAGCTTAC--GATCGAAAACTTCATCACTACGCGGCTTG
19 TCCCT--AAACACAGAGCTTAC--GATCGAAAACTTCATCACTACGCGGCTTG
16 TCCCT--AAACACAGAGCTTAC--GATCGAAAACTTCATCACTACGCGGCTTG
17 TCCCT--AAACACAGAGCTTAC--GATCGAAAACTTCATCACTACGCGGCTTG
11 TCCCT--AAACACAGAGCTTAC--GATCGAAAACTTCATCACTACGCGGCTTG
15 TCCCT--AAACACAGAGCTTAC--GATCGAAAACTTCATCACTACGCGGCTTG
13 TCCCT--AAACACAGAGCTTAC--GATCGAAAACTTCATCACTACGCGGCTTG
14 TCCCT--AAACACAGAGCTTAC--GATCGAAAACTTCATCACTACGCGGCTTG
18 TCCCT--AAACACAGAGCTTAC--GATCGAAAACTTCATCACTACGCGGCTTG
* * * * *

12 C--TCCTCAGACTTCTG--CCATTCGAGAGATTC
19 C--TCCTCAGACTTCTG--CCATTCGAGAGATTC
16 C--TCCTCAGACTTCTG--CCATTCGAGAGATTC
17 C--TCCTCAGACTTCTG--CCATTCGAGAGATTC
11 C--TCCTCAGACTTCTG--CCATTCGAGAGATTC
15 C--TCCTCAGACTTCTG--CCATTCGAGAGATTC
13 C--TCCTCAGACTTCTG--CCATTCGAGAGATTC
14 C--TCCTCAGACTTCTG--CCATTCGAGAGATTC
18 C--TCCTCAGACTTCTG--CCATTCGAGAGATTC
* * * * *

```



Blastn identidade 99% 100%

(11)UCM922:

*Bacillus subtilis*/amiloliquefasciens

UCM (12)1515/(14)1482/(15)1619/(16)1609/(17)1497/(18)1548/(19)2141:

*Bacillus subtilis*/amiloliquefasciens/tequilensis

UCM 1572:

*Paenibacillus xylanensis*/barcinonensis/pabuli

Figura 27. Cluster de sequencias múltiplas: Blastn realizado para os 9 isolados.

Um resumo dos resultados encontrados entre os nove isolados está demonstrado na figura 28 que contem as características fenotípicas dos microrganismos, coloração de Gram, Dados de ação enzimática, testes bioquímicos e sequenciamento de 16S rDNA

Características do microrganismo				Ação enzimática		Testes Bioquímicos										Sequenciamento 16S rDNA				
Código	Coleta	Tempo de Crescimento	Gram	Amilolítico	Proteolíticos	V.P	C.S	Lis	Arg	Orn	Glic	Sac	Ram	Mai	Mel	ONPG	Esc	Bacillus amyloquelaciens e subtilis	Bacillus tequilensis	Paenibacillus xylanexedens, barcinonensis e papuli
UCM0922	1ª	24hs	Bacilo (-)	Sim	SIM		(+)		(+)	(+)	(+)						(+)	X		
UCM1482	3ª	24hs	Bacilo (+)	Sim	SIM	(+)	(+)		(+)	(+)	(+)	(+)		(+)			(+)	X	X	
UCM1497	3ª	24hs	Bacilo (+)	Sim	SIM		(+)		(+)	(+)	(+)					(+)	(+)	X	X	
UCM1515	3ª	24hs	Bacilo (+)	Sim	SIM		(+)		(+)	(+)	(+)	(+)		(+)			(+)	X	X	
UCM1548	3ª	24hs	Bacilo (-)	Sim	SIM		(+)	(+)	(+)		(+)	(+)		(+)			(+)	X	X	
UCM1572	3ª	24hs	Bacilo (+)	Sim	NÃO				(+)		(+)		(+)	(+)	(+)		(+)			X
UCM1609	3ª	24hs	Bacilo (+)	Sim	SIM		(+)			(+)	(+)	(+)		(+)			(+)	X	X	
UCM1619	3ª	24hs	Bacilo (-)	Sim	SIM	(+)	(+)		(+)	(+)				(+)			(+)	X	X	
UCM2141	4ª	24hs	Bacilo (+)	Sim	SIM		(+)			(+)	(+)	(+)		(+)			(+)	X	X	

LISTA DE ABREVIÇÕES

V.P.	Voges Proskauer	ORN	Descarboxilação de ornitina	MAL	Fermentação de maltose
C.S.	Citrato de Simmons	GLIC	Fermentação de glicose	MEL	Fermentação de melobiose
LIS	Descarboxilação de lisina	SAC	Fermentação de sacarose	ONPG	β-D-galactosidase
ARG	Descarboxilação de a rginina	RAM	Fermentação de ramnose	ESC	Hidrólise da esculina

Figura 28 Resumo de atividades. Resultados de Gram, Ação enzimática, teste bioquímico e Sequenciamento 16S rDNA agrupados.

## 6. Conclusão

- 856 microrganismos foram isolados a partir de diferentes momentos do processo de compostagem.
- 440 isolados mostraram-se amilolíticos ou proteolíticos.
- Dentre os 440, 382 são proteolíticos e 322, amilolíticos, com 264 apresentando degradação de ambos os substratos.
- 44 isolados selecionados como melhores produtores de amilase e protease.
- Tendo como base os perfis de secreção de amilase ou protease, tempo de crescimento em meio de cultura sólido e teste de coloração de Gram, os 44 isolados foram classificados em 15 tipos distintos de microrganismos, sendo 9 únicos e 6 grupos de isolados fenotipicamente idênticos, oriundos dos diferentes pontos de coleta ao longo da compostagem.
- Como perspectivas para a continuidade do trabalho, pretendemos continuar a caracterização filogenética dos isolados por Maldi-TOF e análise do 16SrRNA para os amilolíticos e proteolíticos. O perfil enzimático dos isolados será estudado quanto a estabilidade e inserção de resultados no programa Bionumerics, além de confrontar nossos resultados de identificação dos isolados obtidos com o trabalho de metagenômica que está sendo realizado pelo IQ-USP situado na USP.
- Caracterização do tempo ideal de produção de amilase determinado pela atividade específica de cada isolado.
- Sequenciamento do gene 16S rDNA para nove isolados.
- Caracterização de 24 tipos de ensaios bioquímicos para cada isolado.
- Possibilidade de inserção de novos microrganismos ao banco de dados local da análise por espectrometria de massa para outros pesquisadores utilizarem posteriormente.
- Criamos de um banco de microrganismos crio preservados e devidamente catalogados, com características fenotípicas, anotações de características microscópicas, além de um banco de fotos de todo o processo, facilitando a continuidade da pesquisa com esse banco, expressando confiabilidade.

## 7. Referências Bibliográficas

- Ajayi, A. O.; Fagade, O. E. **Heat activation and stability of amylases from *Bacillus* species.** African Journal of Biotechnology Vol. 6 (10), pp. 1181-1184, 16 May 2007.
- AKCAN N. **High Level Production of Extracellular  $\alpha$ -Amylase from *Bacillus licheniformis* ATCC 12759 in Submerged Fermentation.** University of Bucharest, Romania, Vol. 16, n. 6, 2011.
- AKCAN N.; UYAR F.; GÜVEN A. **Alpha-Amylase Production by *Bacillus subtilis* RSKK96 in Submerged Cultivation.** Kafkas Univ Vet Fak Derg 17 (Supl A): S17-S22, 2011.
- ALCARDE, André Ricardo; SOUZA, Paula Araújo de; BELLUCO, André Eduardo de Souza. **Volatilization kinetics of secondary compounds from sugarcane spirits during double distillation in rectifying still.** Sci. agric. (Piracicaba, Braz.), Piracicaba, v. 67, n. 3, 2010
- ALFREIDER, A.; PETERS, S.; TEBBE, C. C.; RANGGER, A.; INSAM, H. **Microbial community dynamics during composting of organic matter as determined by 16S ribosomal DNA analysis.** *Compost. Science & Utilization*, v. 10, p. 303-12, 2002.
- ALLGAIER, M. et al. **Targeted discovery of glycoside hydrolases from a switchgrass-adapted compost community.** *PLoS ONE*, n. 5, v. 1, p. e8812, 2010.
- BANERJEE, A. B.; MINAKSHI, D. E.; AMIT KRISHNA, D. E. **Antimicrobial screening of some Indian spices.** *Physiotherapy Research*, n. 13, p. 616-618, 1999.
- BENT S.J e FORNEY L.J. **The tragedy of the uncommon: understanding limitations in the analysis of microbial diversity.** *ISME J.* n.2 p.689-695, 2008.
- BEVILACQUA, José Luís et al . **Comparação entre citrato trissódico e heparina como solução para selo de cateter em pacientes em hemodiálise.** J. Bras. Nefrol., São Paulo, v. 33, n. 1, Mar. 2011
- BIBBY, K.; VIAU, E.; PECCIA, J. **Pyrosequencing of the 16S rRNA gene to reveal bacterial pathogen diversity in biosolids.** *Water Research*, n. 44, v. 14, p. 4252-4260, 2010.
- BITENCOURT, A. L. V. et al., **Core sampling test in large-scale compost cells for microorganism isolation.** *African Journal of Microbiology Research*, n. 4, v. 15, p. 1631-1634, 2010.
- BLANC, M.; MARILLEY, L.; BEFFA, T.; ARAGNO, M. **Thermophilic bacterial communities in hot composts as revealed by most probable number counts and molecular (16S rDNA) methods.** *Fems Microbiology Ecology*, n. 28, p. 141-149, 1999.
- BLUMER-SCHUETTE, S. E.; KATAEVA, I.; WESTPHELING, J.; ADAMS, M. W.; KELLY, R. M. **Extremely thermophilic microorganisms for biomass conversion: status and prospects.** *Curr Opin Biotechnol*, n. 19, p. 210-217, 2008.



BON, E. P. S. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. 506.

BRAVO FARINAS, LAURA et al . **Marcadores fenotípicos en cepas de Aeromonas aisladas en Cuba de niños con enfermedad diarreica aguda**. Rev Cubana Med Trop, Ciudad de la Habana, v. 47, n. 2, dic. 1995.

CABRERA R, Luis E et al. **Aislamiento e identificación de especies pertenecientes a los géneros Aeromonas, Vibrio y Plesiomonas procedentes de muestras extra-intestinales en Cuba**. Rev. chil. infectol., Santiago, v. 24, n. 3, jun. 2007

CAMPOS, Anastácia Maria de Araújo et al . **Atualização da proteína ideal para frangos de corte: arginina, isoleucina, valina e triptofano**. R. Bras. Zootec., Viçosa , v. 41, n. 2, Feb. 2012 .

CANCELIER, Adriano et al. **Influência de parâmetros de processo na obtenção de bebida fermento-destilada de uva-japão (*Hovenia dulcis Thunberg*)**. Braz. J. Food Technol., Campinas , v. 16, n. 1, Mar. 2013 .

CANTARELLA, Heitor et al . **Ammonia volatilisation from urease inhibitor-treated urea applied to sugarcane trash blankets**. Sci. agric. (Piracicaba, Braz.), Piracicaba , v. 65, n. 4, 2008

CARVALHO, Gleidson Giordano Pinto de et al . **Balanço de nitrogênio, concentrações de ureia e síntese de proteína microbiana em caprinos alimentados com dietas contendo cana-de-açúcar tratada com óxido de cálcio**. R. Bras. Zootec., Viçosa , v. 39, n. 10, Oct. 2010.

CIPRIANO, M. A. P.; PATRICIO, F. R. A.; FREITAS, S. S. **Potencial de rizobactérias na promoção de crescimento e controle da podridão radicular em alface hidropônica**. Summa phytopathol., Botucatu , v. 39, n. 1, mar. 2013

CLAYDON, M. A.; DAVEY, S. N.; EDWARDS-JONES, V.; GORDON, D. B. **The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry**. *Nat Biotechnol*, n. 14, p. 1584-1586, 1996.

D'AGOSTINI, Érica Clarissa et al . **Low carbon/nitrogen ratio increases laccase production from basidiomycetes in solid substrate cultivation**. Sci. agric. (Piracicaba, Braz.), Piracicaba , v. 68, n. 3, June 2011

DEES, P. M.; GHIORSE, W. C. **Microbial diversity in hot synthetic compost as revealed by PCR-amplified rRNA sequences from cultivated isolates and extracted DNA**. *Fems Microbiology Ecology*, n. 35, p. 207-216, 2001.

DEMIRJIAN, D. C.; MORIS-VARAS, F.; CASSIDY, C. S. **Enzymes from extremophiles**. *Curr Opin Chem Biol*, n. 5, p. 144-51, 2001.

FENSELAU, C. **Mass spectrometry for characterization of microorganisms**. Washington: Americal Chemical Society, 1993.

- FERREIRA, D.J. et al . **Perfil fermentativo e valor nutritivo de silagem de capim-elefante inoculada com *Streptococcus bovis***. Arch. zootec., Córdoba, v. 60, n. 232, dic. 2011.
- FIALHO, Lucimar Lopes et al. **Interferência da lignina na quantificação de radicais livres no processo de compostagem**. Quím. Nova, São Paulo , v. 33, n. 2, 2010
- FITZPATRICK, G. E.; WORDEN, E. C.; VENDRAME, W. A. **Historical development of composting technology during the 20<sup>th</sup> century**. *Horttechnology*, n. 15, v. 1, p. 48-51, 2005.
- FRANKE-WHITTLE, I. H.; KNAPP, B. A.; FUCHS, J.; KAUFMANN, R.; INSAM, H. **Application of COMPOCHIP microarray to investigate the bacterial communities of different composts**. *Microb Ecol*, n. 57, p. 510-21, 2009.
- GAJALAKSHMI, S.; ABBASI, S. A. **Solid waste management by composting: State of the art**. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, n. 38, v. 5, p. 311-400, 2008.
- GORLACH-LIRA, Krystyna; COUTINHO, Henrique D.M.. Population dynamics and extracellular enzymes activity of mesophilic and thermophilic bacteria isolated from semi-arid soil of Northeastern Brazil. *Braz. J. Microbiol.*, São Paulo , v. 38, n. 1, Mar. 2007
- GUO, Y.; ZHU, N.; ZHU, S.; DENG, C. **Molecular phylogenetic diversity of bacteria and its spatial distribution in composts**. *J Appl Microbiol*, n. 103, p. 1344-54, 2007.
- HANSGATE, A. M.; SCHLOSS, P. D.; HAY, A. G.; WALKER, L. P. **Molecular characterization of fungal community dynamics in the initial stages of composting**. *FEMS Microbiol Ecol*, n. 51, p. 209-214, 2005.
- HARUTA, S.; KONDO, M.; NAKAMURA, K.; CHANCHITPRICHA, C.; AIBA, H.; ISHII, M.; IGARASHI, Y. **Succession of a microbial community during stable operation of a semi-continuous garbage-decomposing system**. *Journal of Biosci and Bioengineering*, n. 98, p. 20-27, 2004.
- HAUG, R. T. **Practical handbook of compost engineering**. Londres: Lewis Publisher, 1993.
- HIGGINS C.W e WALKER L.P. **Validation of a new model for aerobic organic solids decomposition: simulations with substrate specific kinetics**. *Proc. Biochem.* n.36 p.875-884, 2001.
- HSIEH, S. Y., TSENG, C. L., LEE, Y. S., KUO, A. J., SUN, C. F., LIN, Y. H. & CHEN, J. K. **Highly efficient classification and identification of human pathogenic bacteria by MALDI-TOF MS**. *Mol Cell Proteomics*, n. 7, p. 448-456, 2008.
- HULTMAN, J. et al. **Determination of fungal succession during municipal solid waste composting using a cloning-based analysis**. *J Appl Microbiol*, n. 108, v. 2, p. 472-87, 2010.
- JAENICKE, S. et al. **Comparative and joint analysis of two metagenomic datasets from a biogas fermenter obtained by 454-pyrosequencing**. *PLoS ONE*, n. 6, v. 1, 2011.
- KLINDWORTH, A. et al. **Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies**. *Nucleic Acids Res.*, n. 1, p. 1-11, 2013.

- KOWALCHUK, G. A.; NAOUMENKO, Z. S.; DERIKX, P. J. L.; FELSKE, A.; STEPHEN, J. R.; ARKHIPCHENKO, I. A. **Molecular analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class *Proteobacteria* in compost and composted materials.** *Applied and Environmental Microbiology*, n. 65, p. 396-403, 1999.
- KRAUSE, L. et al. **Taxonomic composition and gene content of a methane-producing microbial community isolated from a biogas reactor.** *Journal of Biotechnology*, n. 136, v. 1-2, p. 91-101, 2008.
- LAMONTAGNE, M. G. et al. **Evaluation of extraction and purification methods for obtaining PCR-amplifiable DNA from compost for microbial community analysis.** *Journal of Microbiological Methods*, n. 49, v. 3, p. 255-264, 2002.
- LEÃO, S. C. et al. **Draft Genome Sequence of *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* INCQS 00594** *Genome Announcements*, v. 1, n. 6 nov. / dec. 2013.
- LEAO, Jean Pacheco et al. **Anatomopatologia de amostras de bovinos alimentados com glicerol.** *Cienc. Rural*, Santa Maria , v. 42, n. 7, July 2012.
- LEYVA, Virginia et al. **Primer estudio de *Enterobacter sakazakii* en alimentos en Cuba.** *Rev Cubana Salud Pública*, Ciudad de La Habana, v. 34, n. 4, dic. 2008.
- LIMA, Cristiane Pereira de et al. **Resistência de bactérias ácido-láticas a bacteriófagos provenientes de unidades de processamento de queijo Coalho.** *Cienc. Rural*, Santa Maria , v. 42, n. 6, June 2012.
- LINS, U. et al. **Simple homemade apparatus for harvesting uncultured magnetotactic microorganisms.** *Braz. J. Microbiol.* n.2. v.34, p. 111-116, 2003.
- LOCATELLI, J. R. et al. **Synthesis, characterization and thermal behaviour of heavy trivalent lanthanide malonates.** *Eclet. Quím.*, São Paulo , v. 35, n. 4, 2010.
- MARCHESAN, Enio et al. **Agronomic performance of rice to the use of urease inhibitor in two cropping systems.** *Rev. Ciênc. Agron.*, Fortaleza , v. 44, n. 3, Sept. 2013
- MARTINS, L. F. et al. **Metagenomic Analysis of a Tropical Composting Operation at the São Paulo Zoo Park Reveals Diversity of Biomass Degradation Functions and Organisms** *Plos One*, v. 8, n. 4, Apr. 2013.
- MARVIN, L. F.; ROBERTS, M. A.; FAY, L. B. **Matrix-assisted laser desorption/ionization time of-flight mass spectrometry in clinical chemistry.** *Clin Chim Acta*, n. 337, p. 11-21, 2003.
- MOHITE, B. **Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth.** *J. Soil Sci. Plant Nutr*, Temuco, v. 13, n. 3, sept. 2013.

MUÑOZ, J.; QUINTERO M.; GUTIÉRREZ P. A. **Characterization of the  $\alpha$ -amylase gene from *Bacillus sp. BBM1 Vitae***, Revista de La facultad de química farmacêutica, Colombia, V. 18 n. 3, p, 279-286. Set. 2011.

NAKASAKI . et al. **A newly isolated thermophilic bacterium. *Bacillus lichniformis* HA1 to accelerate the organic matter decomposition in high rate composting.** *Compost Sci. Util.* n.2 p. 88-96, 1994.

NETO, Luciano; MENDES-FERREIRA, Ana Alexandra. **Pesquisa de atividade sulfito redutase em leveduras de origem enológica.** Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas , v. 25, n. 2, June 2005

OLIVEIRA, Adriana Cristina de; PAULA, Adriana Oliveira de. **Descolonização de portadores de *Staphylococcus aureus*: indicações, vantagens e limitações.** Texto contexto - enferm., Florianópolis , v. 21, n. 2, jun. 2012 .

OLIVEIRA, Patrícia Perondi Anchão et al. **Fertilização com N e S na recuperação de pastagem de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu em neossolo quartzarênico.** R. Bras. Zootec., Viçosa , v. 34, n. 4, Aug. 2005.

PARTANEN, P. et al. **Bacterial diversity at different stages of the composting process.** *BMC Microbiology*, n. 10, p. 1-12, 2010.

PASCON, R. C.; BERGAMO, R. F.; SPINELLI, R. X.; SOUZA, E. D.; ASSIS, D. M.; JULIANO, L.; VALLIM, M. A. **Amylolytic microorganism from São Paulo Zoo composting: isolation, identification, and amylase production.** *Enzyme Research*, 2011.

PETERS, S.; KOSCHINSKY, S.; SCHWIEGER, F.; TEBBE, C. C. **Succession of microbial communities during hot composting as detected by PCR-single-strand-conformation polymorphism-based genetic profiles of small-subunit rRNA genes.** *Applied and Environmental Microbiology*, n. 66, p. 930-936, 2000.

PODESTA, Guilherme Silva de et al . ***Meloidogyne javanica* control by *Pochonia chlamydosporia*, *Gracilibacillus dipsosauri* and soil conditioner in tomato.** Summa phytopathol., Botucatu , v. 39, n. 2, jun. 2013.

REUTER, T. et al. **Purification of polymerase chain reaction (PCR)-amplifiable DNA from compost piles containing bovine mortalities.** *Bioresource Technology*, n. 100, v. 13, p. 3343-3349, 2009.

RIAZ et al. **Characterization of  $\alpha$ -Amylase by *Bacillus subtilis*,** International Jornal of agriculture & Biology, Lahore-Pakistan Vol. 5, No. 3, 2003

ROQUE, Fátima et al. **Development and stability assessment of liquid paediatric formulations containing sildenafil citrate.** Braz. J. Pharm. Sci., São Paulo , v. 49, n. 2, June 2013

SCHLOSS, P. D. et al. **Quantifying bacterial population dynamics in compost using 16S rRNA gene probes.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, n. 66, v. 4, p. 457-463, 2005.

SOUZA, F. de; BRAGANCA, S. R. **Caracterização tecnológica de um calcário dolomítico *in natura*, calcinado e sulfatado como meio dessulfurante.** Cerâmica, São Paulo, v. 59, n. 350, June 2013.

SOUZA, Ozair et al. **Energia alternativa de biomassa: bioetanol a partir da casca e da polpa de banana.** Rev. bras. eng. agríc. ambient., Campina Grande , v. 16, n. 8, Aug. 2012.

SPOR, A.; KOREN, O.; LEY, R. **Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome.** *Nature Reviews Microbiology*, n. 9, v. 4, p. 279-90, 2011.

STROM P.F. **Identification of thermophilic bacteria in solid-waste composting.** *Appl. Environ. Microbiol.* n.50 p.906-913, 1985a.

STROM P.F. **Effect of temperature on bacterial species diversity in thermophilic solid waste composting.** *Appl. Environ. Microbiol.* n.50 p.899-905, 1985b.

TEBALDI, Victor Maximiliano Reis et al. **Isolamento de coliformes, estafilococos e enterococos de leite cru provenientes de tanques de refrigeração por expansão comunitários: identificação, ação lipolítica e proteolítica.** Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas , v. 28, n. 3, Sept. 2008

TEIXEIRA, Cícero Monti et al . **Decomposição e liberação de nutrientes das palhadas de milho e milho + crotalaria no plantio direto do feijoeiro.** Acta Sci., Agron. (Online), Maringá , v. 31, n. 4, Dec. 2009.

TEODORO, Carlos Eduardo de Souza; MARTINS, Meire Lelis Leal. **Culture conditions for the production of thermostable amylase by *Bacillus sp.*** Braz. J. Microbiol., São Paulo , v. 31, n. 4, Oct. 2000.

TIQUIA, S. M. **Microbiological parameters as indicators of compost maturity.** *Journal of Applied Microbiology*, n. 99, v. 4, p. 816-828, 2005.

TIQUIA, S. M. et al. **Bacterial community profiles on feathers during composting as determined by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of 16S rDNA genes.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, n. 67, v. 3, p. 412-419, 2005.

TSUKAMOTO, Junko; DURAN, Nelson; TASIC, Ljubica. **Nanocellulose and bioethanol production from orange waste using isolated microorganisms.** J. Braz. Chem. Soc., São Paulo, v. 24, n. 9 Sept. 2013

VANDERGHEYNST J.S. et al. **High-solids aerobic decomposition: pilot-scale reactor development and experimentation.** *Proc. Biochem.* n.32 p.361-375, 1997.

VARGHA, M.; TAKATS, Z.; KONOPKA, A.; NAKATSU, C. H. **Optimization of MALDI-TOF MS for strain level differentiation of *Arthrobacter* isolates.** *J Microbiol Methods*, n. 66, p. 399-409, 2006.

VASCONCELLOS, R. L. F. de et al. **Isolation and screening for plant growth-promoting (PGP) actinobacteria from Araucaria angustifolia rhizosphere soil.** Sci. agric. (Piracicaba, Braz.), Piracicaba , v. 67, n. 6, dez. 2010

VIAU, E.; PECCIA, J. **Evaluation of the enterococci indicator in biosolids using culture-based and quantitative PCR assays.** *Water Research*, n. 43, v. 19, p. 4878-4887, 2009.

WALKER, J.; FOX, A. J.; EDWARDS-JONES, V.; GORDON, D. B. **Intact cell mass spectrometry (ICMS) used to type methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: media effects and inter-laboratory reproducibility.** *J Microbiol Methods*, n. 48, p. 117-126, 2002.